



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년03월23일
(11) 등록번호 10-1129098
(24) 등록일자 2012년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 3/06 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7003941
(22) 출원일자(국제) 2004년08월26일
심사청구일자 2009년07월03일
(85) 번역문제출일자 2006년02월27일
(65) 공개번호 10-2006-0119889
(43) 공개일자 2006년11월24일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2004/012282
(87) 국제공개번호 WO 2005/021564
국제공개일자 2005년03월10일
(30) 우선권주장
JP-P-2003-00304964 2003년08월28일 일본(JP)
JP-P-2004-00174880 2004년06월14일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
W0200190338 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸조
일본국 오카야마현 오카야마시 기타구 시모이시 1쵸메 2-3
(72) 발명자
무카이 가즈히사
일본국 오카야마현 오카야마시 시모이시 1쵸메 2-3가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸조 내
와타나베 히카루
일본국 오카야마현 오카야마시 시모이시 1쵸메 2-3가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸조 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
서장찬, 최재철, 김기중

전체 청구항 수 : 총 26 항

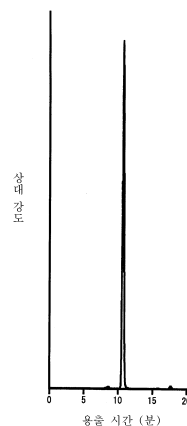
심사관 : 김범수

(54) 발명의 명칭 환상 말토실 말토오스 및 환상 말토실 말토오스 생성효소와 이들의 제조 방법 및 용도

(57) 요약

글루코오스를 구성당으로 하는 신규의 비환원성 당질을 제공하고, 비환원성 당질의 선택의 폭을 넓힘과 아울러 이 비환원성 당질을 생성하는 신규 효소와, 이들의 생성 방법 및 제조방법, 이 효소를 코딩하는 DNA, 이것을 함유해서 된 재조합 DNA 및 형질 전환체, 및 더욱이 이 비환원성 당질을 함유해서 된 조성물과 그 용도를 제공하는 것을 과제로 하고, 사이클로{→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→)}의 구조를 가진 신규의 환상 당질, 즉 환상 말토실 말토오스와 이것을 생성하는 신규의 환상 말토실 말토오스 생성효소와 이들의 생성 방법 및 제조방법, 더욱이는 이 효소를 코딩하는 DNA와 이것을 함유해서 된 재조합 DNA 및 형질 전환체, 및 환상 말토실 말토오스 또는 이것을 함유한 당질을 함유해서 된 조성물과 그 용도를 제공함으로써 상기 과제를 해결한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

니시모토 도모유키

일본국 오키야마켄 오키야마시 시모이시 1쵸메 2-3가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸 조 내

구보타 미치오

일본국 오키야마켄 오키야마시 시모이시 1쵸메 2-3가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸 조 내

후쿠다 시게하루

일본국 오키야마켄 오키야마시 시모이시 1쵸메 2-3가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸 조 내

미야케 도시오

일본국 오키야마켄 오키야마시 시모이시 1쵸메 2-3가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸 조 내

특허청구의 범위

청구항 1

사이클로{→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→}의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스.

청구항 2

글루코오스 중합도가 3 이상인 α-1,4 글루칸에 작용하여, 사이클로{→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→}의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스를 생성하는 작용을 갖고, 아래의 이화학적 성질을 가진 환상 말토실 말토오스 생성효소:

(1) 분자량

SDS-겔 전기 영동법에서, $72,000 \pm 20,000$ 달톤;

(2) 등전점

앰플라인 함유 등전점 전기 영동법에서, pI 3.6 ± 0.5 ;

(3) 최적 온도

pH 6.0, 30분간 반응의 조건하에서, 50℃ 내지 55℃;

(4) 최적 pH

40℃, 30분간 반응의 조건하에서, pH 5.5 내지 6.5;

(5) 온도 안정성

pH 6.0, 60분간 유지의 조건하에서, 30℃까지 안정;

1mM 칼슘 이온 존재 하에서는, 50℃까지 안정;

(6) pH 안정성

4℃, 24시간 유지의 조건하에서, pH 5.0 내지 9.0에서 안정.

청구항 3

삭제

청구항 4

제2항에 있어서, N 말단 아미노산 서열로서 서열표에서의 서열번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열을 가진 환상 말토실 말토오스 생성효소.

청구항 5

제2항 또는 제4항에 있어서, 서열표에서의 서열번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열을 가진 환상 말토실 말토오스 생성효소.

청구항 6

제2항 또는 제4항에 있어서, 글루코오스 중합도가 3 이상인 α-1,4 글루칸이 말토올리고당, 말토텍스트린, 아밀로텍스트린, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 가용성 전분, 액화 전분, 호화 전분 및 글리코겐으로부터 선택되는 당질인 환상 말토실 말토오스 생성효소.

청구항 7

제2항 또는 제4항에 있어서, 환상 말토실 말토오스 생성효소가 아스로박터 글로비포르미스(*Arthrobacter globiformis*) 유래의 효소인 환상 말토실 말토오스 생성효소.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 아스로박터 글로비포르미스가 아스로박터 글로비포르미스(*Arthrobacter globiformis*) M6 (일본국 독립 행정법인 산업기술 종합연구소 특허 생물 기탁 센터, 기탁 번호 FERM BP-8448) 또는 그 변이주인 환상 말토실 말토오스 생성효소.

청구항 10

아스로박터 글로비포르미스 M6(일본국 독립 행정법인 산업기술 종합연구소 특허 생물 기탁 센터, 기탁 번호 FERM BP-8448) 또는 그 변이주인 환상 말토실 말토오스 생성효소 산생 능력을 가진 미생물.

청구항 11

삭제

청구항 12

서열표에서의 서열번호 3으로 나타내어지는 염기서열, 또는 그것에 상보적인 염기서열을 가진 제5항에 기재한 환상 말토실 말토오스 생성효소를 코드하는 DNA.

청구항 13

제12항에 있어서, 유전자 코드의 축중(縮重)에 근거하여, 코드하는 아미노산 서열을 변경함이 없이, 서열표에서의 서열번호 3으로 나타내어지는 염기서열에서의 염기를 다른 염기로 치환한 DNA.

청구항 14

제12항에 있어서, 아스로박터 속 미생물에서 유래하는 DNA.

청구항 15

제12항에 기재한 DNA와, 자율 복제가능한 벡터를 함유해서 된 복제가능한 재조합 DNA.

청구항 16

삭제

청구항 17

제15항에 기재한 재조합 DNA를 대장균, 고초균, 방선균 및 효모로부터 선택되는 숙주에 도입해서 된 형질 전환체.

청구항 18

삭제

청구항 19

제2항 또는 제4항에 기재한 환상 말토실 말토오스 생성효소의 산생 능력을 가진 아스로박터 글로비포르미스(*Arthrobacter globiformis*)를 영양 배지에서 배양해서 얻어지는 배양물로부터, 제2항 또는 제4항에 기재한 환상 말토실 말토오스 생성효소를 채취하는 것을 특징으로 하는 환상 말토실 말토오스 생성효소의 제조 방법.

청구항 20

삭제

청구항 21

제19항에 있어서, 아스로박터 글로비포르미스가 아스로박터 글로비포르미스 M6(일본국 독립 행정법인 산업기술 종합연구소 특허 생물 기탁 센터, 기탁 번호 FERM BP-8448) 또는 그 변이주인 환상 말토실 말토오스 생성효소의 제조 방법.

청구항 22

제17항에 기재한 형질 전환체를 배양하고, 배양물로부터 재조합형 환상 말토실 말토오스 생성효소를 채취하는 것을 특징으로 하는 재조합형 환상 말토실 말토오스 생성효소의 제조 방법.

청구항 23

글루코오스 중합도가 3 이상인 α -1,4 글루칸을 함유하는 용액에 제2항 또는 제4항에 기재한 환상 말토실 말토오스 생성효소를 작용시키는 것을 특징으로 하는, 사이클로{ \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)}의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스의 생성 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 글루코오스 중합도가 3 이상인 α -1,4 글루칸이, 말토올리고당, 말토텍스트린, 아밀로텍스트린, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 가용성 전분, 액화 전분, 호화 전분 및 글리코젠으로부터 선택되는 당질인 생성 방법.

청구항 25

사이클로{ \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스와 다른 당질을 함유해서 된 환상 말토실 말토오스 함유 당질.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

제25항에 있어서, 형태가 시럽, 매스키트, 비정질 분말, 비정질 고상물, 결정 또는 결정 고상물 중의 어느 하나인 것을 특징으로 하는 환상 말토실 말토오스 함유 당질.

청구항 30

전분을 호화 또는 액화한 용액에, 제2항 또는 제4항에 기재한 환상 말토실 말토오스 생성효소를 작용시키는 것을 특징으로 하는, 사이클로{ \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스 또는 이것을 포함하는 당질의 제조 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 전분을 호화 또는 액화한 용액이 텍스트로오스 당량(Dextrose Equivalent, DE) 0 초과 20 이하의 용액인 제조 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 전분을 호화 또는 액화한 용액에, 상기 환상 말토실 말토오스 생성효소와 함께 이소아밀라아

제를 작용시키는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 전분을 호화 또는 액화한 용액에, α -아밀라아제, β -아밀라아제, 사이클로말토덱스트린글루카노트란스페라제, 글루코아밀라아제, α -글루코시다아제로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상의 효소를 더 작용시키는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

제1항에 기재한 환상 말토실 말토오스 또는 제25항에 기재한 환상 말토실 말토오스 함유 당질을 함유하는 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 조성물이 음식물 또는 화장품인 조성물.

청구항 38

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 사이클로{ $\rightarrow 6$ }- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)}의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스(이하, 본 명세서에서는 간단히 「환상 말토실 말토오스」라고 약칭할 경우도 있음) 및 환상 말토실 말토오스 생성효소와 이들의 제조 방법과 용도 및 이 효소를 코딩하는 DNA와 이것을 함유해서 된 재조합 DNA에 관한 것으로서, 상세히는, 환상 말토실 말토오스 및 환상 말토실 말토오스 생성효소와 그 제조 방법, 환상 말토실 말토오스 생성효소를 산생(產生)하는 미생물, 이 효소를 코딩하는 DNA와 이것을 함유해서 된 재조합 DNA와 형질 전환체, 이 효소를 이용한 환상 말토실 말토오스의 생성 방법 및 제조 방법, 및 환상 말토실 말토오스를 함유시킨 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 글루코오스를 구성당(構成糖)으로 하는 당질로서는, 예를 들면, 전분을 원료로 하여 제조되는 전분 부분 분해물인 아밀로오스, 아밀로덱스트린, 말토덱스트린, 말토올리고당, 이소말토올리고당 등이 알려져 있다. 이들 당질은, 통상, 분자의 양단(兩端)에 비환원성 말단과 환원성 말단을 가지고, 환원성을 나타내는 것이 알려져 있다. 일반적으로, 전분 부분 분해물은 그 고형물 당(當)의 환원력 크기를 텍스트로오스 당량(Dextrose Equivalent, DE)으로 나타낸다. 이 값이 큰 것은, 통상, 분자가 작고 저점도이며, 단맛이 강하지만, 반응성이 강하여 아미노산이나 단백질 등의 아미노기를 가진 물질과 아미노카르보닐 반응을 일으키기 쉽고, 갈변하며, 악취를 발생하여 품질을 열화(劣化)하기 쉬운 성질이 있는 것이 알려져 있다.

[0003] 이와 같은 결점을 개선하기 위하여, 전분 부분 분해물의 구성당인 글루코오스를 변경하지 않고, 그 환원력을 저감, 혹은 소멸시키는 방법이 옛날부터 요망되고 있었다. 예를 들면, 문헌[Journal of American Chemical Society, 미국, 1949년, 제71권, 353 내지 358 페이지]에 개시되어 있는 바와 같이, 전분에 마세란스 아밀라아제(macerans amylase)를 작용시킴으로써, 6 내지 8 분자의 글루코오스가 α -1,4 글루코시드 결합한 α -, β - 또는 γ -사이클로덱스트린을 생성시키는 방법이 알려져 있다. 현재로서는, 전분으로부터 이들 사이클로덱스트린이 공업적 규모로 생산되고, 이들 사이클로덱스트린은 그것들이 가진 비환원성이고, 무미하며, 포접(包接) 능력을 가지는 등의 특성을 살린 용도에 이용되고 있다.

[0004] 또한, 먼저, 본 출원인이 일본국의 특개평7-143876호 공보, 특개평7-213283호 공보 등에서 개시한 바와 같이, 말토올리고당 등의 전분 부분 분해물에 비환원성 당질생성 효소 및 트레할로오스 유리 효소를 작용시킴으로써, 2 분자의 글루코오스가 α , α -1,1 결합한 트레할로오스를 생성시키는 방법도 알려져 있다. 현재로서는, 전분으로부터 트레할로오스가 공업적 규모로 생산되어, 그 비환원성 및 온화함으로 인해서 고품질의 단맛 특성을 살린 용도에 이용되고 있다. 더욱이, 앞서, 본 출원인이 국제공개 WO 01/90338 A1호 명세서, 국제공개 WO 02/055708 A1호 명세서, 국제공개 WO 02/40659 A1호 명세서 등에서 개시한 바와 같이, 전분 또는 그 부분 분해물에 α -이소말토실 글루코 당질생성 효소와 α -이소말토실 전이 효소를 작용시킴으로써, 4 분자의 글루코오스가 α -1,3 글루코시드 결합 및 α -1,6 글루코시드 결합에 의해 교대로 결합한 구조, 즉, 사이클로{ \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 3)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 3)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 환상 4당을 생성시키는 방법도 알려져 있다. 이 환상 4당은 환상구조를 가지므로 포집 능력을 가지며, 휘발성 유기물을 안정화하는 작용을 나타냄과 아울러 비환원성의 당질이기 때문에 아미노카르보닐 반응을 일으키지 않고, 갈변, 열화를 우려하지 않고서도 이용, 가공할 수 있는 것이 기대된다.

[0005] 이와 같이, 글루코오스를 구성당으로 하는 비환원성 당질로서, 글루코오스 중합도가 6 내지 8인 α -, β -, γ -사이클로덱스트린, 글루코오스 중합도가 2인 α , α -트레할로오스 및 글루코오스 중합도가 4인 사이클로{ \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 3)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 3)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 환상 4당은 각각의 특성을 살려서 여러 가지 분야에 이용되고 있는데, 이들 당질 이외에도 글루코오스를 구성당으로 하는 비환원성 당질이 제공되면 비환원성 당질의 선택의 폭이 넓어지고, 더욱이 다양한 용도에서의 이용이 기대된다.

발명의 상세한 설명

[0006] 본 발명의 과제는, 글루코오스를 구성당으로 하는 신규의 비환원성 당질을 제공하고, 비환원성 당질의 선택의 폭을 넓힘과 아울러 이 비환원성 당질을 생성하는 신규 효소와, 이들의 생성 방법 및 제조 방법, 이 효소를 코딩하는 DNA, 이것을 함유해서 된 재조합 DNA 및 형질 전환체, 및 이 비환원성 당질을 함유해서 된 조성물과 그 용도를 제공하는 것에 있다.

[0007] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여, 전분 부분 분해물로부터 신규의 비환원성 당질을 생성하는 전혀 새로운 효소에 기대를 걸고, 이러한 효소를 산생하는 미생물을 널리 검색해 왔다. 그 결과, 일본국 오카야마현 오카야마시의 토양으로부터 새롭게 분리한 신규 미생물, 아스로박터(*Arthrobacter*)속(屬)에 속하는 신규 미생물 M6주가 신규의 효소를 산생하고, 이 신규 효소의 작용에 의해, 전분 또는 그 부분 분해물 등의 α -1,4 글루칸으로부터 사이클로{ \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 신규의 환상 당질, 즉 환상 말토실 말토오스를 현저한 양으로 생성하는 것을 발견하였다. 또한 환상 말토실 말토오스 생성효소의 여러 가지 성질을 밝힘과 아울러 그 제조 방법을 확립하고, 또한, 이 효소를 코딩하는 DNA와 이것을 함유해서 된 재조합 DNA 및 형질 전환체를 확립하며, 또한 이 효소에 의한 환상 말토실 말토오스 생성 방법, 및 이 효소를 이용한 환상 말토실 말토오스 또는 이것을 함유하는 당질의 제조 방법을 확립하였다.

[0008] 더욱이는 환상 말토실 말토오스는 그 과포화 수용액으로부터 결정을 용이하게 결정석출하여 채취할 수 있는 것을 발견하고, 또한 환상 말토실 말토오스가 메틸 알코올, 에틸 알코올이나 아세트산 등의 휘발 성분을 포집(包接)하는 작용을 가진 것, 아미노카르보닐 반응을 일으키지 않고 갈변이나 열화가 적은 것, 열이나 pH에 대하여 안정한 것, 난(難)소화성?난(難)발효성인 것 등의 유용한 특성을 가지고 있는 것을 발견하고, 환상 말토실 말토오스, 또는 이것을 함유하는 당질을 함유시킨 조성물, 예를 들면, 풍미 양호한 고품질의 식품, 저칼로리 또는 다이어트 식품, 안정하고 고품질의 화장품, 더욱이는 고활성이고 안정한 의약품 등을 용이하게 제조할 수 있는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명은, 사이클로{ \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 신규의 환상 당질, 즉, 환상 말토실 말토오스와 그것을 생성하는 신규의 환상 말토실 말토오스 생성효소와 그것들의 생성 방법 및 제조 방법, 더욱이는 이 효소를 코딩하는 DNA와 이것을 함유해서 된 재조합 DNA 및 형질 전환체, 및 환상 말토실 말토오스 또는 이것을 함유하는 당질을 함유해서 된 조성물과 그 용도를 제공함으로써 상기 과제를 해결하는 것이다.

[0010] 본 발명에 의하면, 글루코오스를 구성당으로 하는 비환원성 당질의 선택의 폭이 넓어짐으로써, 종래 미지였던 신규의 환상 당질, 환상 말토실 말토오스를 대량으로 공급할 수 있게 되어, 음식물, 화장품, 의약품을 비롯한

여러 가지 분야에서의 이용이 가능해진다.

실시예

[0028]

삭제

[0029]

본 발명에서 말하는 환상 말토실 말토오스라 함은, 4 분자의 글루코오스가 α -1,4 글루코시드 결합 및 α -1,6 글루코시드 결합에 의해 교대로 결합한 환상의 4당, 즉, 사이클로(\rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 환상의 4당을 의미한다. 이 당질은 토양으로부터 얻은 미생물의 배양액 중에서 본 발명자들이 처음으로 발견한 종래 미지의 신규 당질이며, 글루코오스를 구성당으로 하는 환상의 4당은 상기 구조를 가지고 있는 한, 그 공급원, 형태, 순도, 제조 방법을 막론하고 본 발명에 포함된다.

본 발명에서 말하는 환상 말토실 말토오스 생성효소라 함은, 글루코오스 중합도 3 이상인 α -1,4 글루칸에 작용하여, 말토오스를 다른 α -1,4 글루칸의 비환원 말단 글루코오스의 6위치에 α -1,6 전이함으로써 6- α -말토실 α -1,4 글루칸을 생성하고, 이어서, 이것을 환상화 반응에 의해 사이클로(\rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스를 생성하는 효소 전반을 의미한다. 상기의 반응을 촉매하는 효소는 그 공급원, 형태, 조(粗)효소 또는 정제 효소의 구별없이 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소에 포함된다.

[0030]

본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 효소 활성은 다음과 같이 해서 측정할 수 있다. 가용성 전분을 농도 2w/v%가 되도록 2mM 염화 칼슘을 함유하는 50mM 아세트산 완충액(pH 6.0)에 용해시켜 기질액(基質液)으로 하고, 그 기질액 0.5ml에 효소액 0.5ml를 가하여 40℃에서 30분간 효소반응하고, 그 반응액을 10분간, 약 100℃에서 가열해서 반응을 정지시킨 후, 잔존 가용성 전분이나 협잡(挾雜) 올리고당을 분해하기 위해서 α -글루코시다아제를 고형물 1 그램당 4000 단위와 글루코아밀라아제를 고형물 1 그램당 250 단위 첨가해서 50℃에서 1시간 처리하고, 그 처리액 중의 환상 말토실 말토오스량을, 다음에 설명하는 실험 1에 기재한 HPLC법으로 정량한다. 환상 말토실 말토오스 생성효소의 활성 1 단위는, 상기의 조건하에서 1분간에 1 μ 몰의 환상 말토실 말토오스를 생성하는 효소량으로 정의한다.

[0031]

본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 구체적인 예로서는, 아래의 이화학적 성질을 가진 환상 말토실 말토오스 생성효소를 들 수 있다.

[0032]

(1) 분자량

[0033]

SDS-겔 전기 영동법에서, 72,000 \pm 20,000 달톤.

[0034]

(2) 등전점

[0035]

앰폴라인 함유 등전점 전기 영동법에서, pI 3.6 \pm 0.5.

[0036]

(3) 최적 온도

[0037]

pH 6.0, 30분간 반응의 조건하에서, 50℃ 내지 55℃.

[0038]

(4) 최적 pH

[0039]

40℃에서 30분간 반응의 조건하에서, pH 5.5 내지 6.5.

[0040]

(5) 온도 안정성

[0041]

pH 6.0, 60분간 유지의 조건하에서, 30℃까지 안정.

[0042]

1mM 칼슘 이온 존재 하에서는 50℃까지 안정.

[0043]

(6) pH 안정성

[0044]

4℃에서 24시간 유지의 조건하에서, pH 5.0 내지 9.0에서 안정.

[0045]

또한, 상기 이화학적 성질을 가진 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 하나는, 상기 이화학적 성질뿐만 아니라, 그 N 말단 서열로서 서열표에서의 서열번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열을 가지고 있는 경우가 있

다.

- [0046] 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는, 통상, 소정의 아미노산 서열을 가지고 있는데, 그 한가지 예를 들면, 서열표에서의 서열번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열 또는 그에 상동적인 아미노산 서열을 들 수 있다. 서열표에서의 서열번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열에 상동적인 아미노산 서열을 가진 변이체 효소로서는, 글루코오스 중합도 3 이상인 α -1,4 글루칸에 작용하여, 환상 말토실 말토오스를 생성한다고 하는 효소 활성을 유지하는 범위에서, 서열번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열에 있어서 1개 또는 2개 이상의 아미노산이 결실, 치환 혹은 부가한 아미노산 서열을 가진 것을 들 수 있고, 서열번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열에 대하여, 통상, 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가진 아미노산 서열을 가진 것이 아주 적합하다.
- [0047] 그러나 상기 이화학적 성질 또는 아미노산 서열을 가진 환상 말토실 말토오스 생성효소는 어디까지나 한가지 예이며, 상기와 다른 이화학적 성질 또는 아미노산 서열을 가진 효소도, 환상 말토실 말토오스를 생성하는 한, 본 발명에 포함되는 것은 말할 필요도 없다.
- [0048] 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는 그 공급원에 의해 제한되지 않지만, 바람직한 공급원으로서 미생물을 들 수 있고, 특히 본 발명자들이 토양으로 부터 단리한 미생물 M6주가 적절하게 사용된다. 이하, 환상 말토실 말토오스 생성효소 산생능을 가진 미생물 M6주의 확인시험 결과를 나타낸다. 그리고 이 확인시험은, 『微生物의 分類와 同定』(일본국의 長谷川武治편, 學會出版센터, 1985년)에 준하여 하였다.
- [0049] <A: 세포 형태>
- [0050] (1) 육즙 한천 배양, 27℃
- [0051] 보통 0.4×1.0 내지 $0.8 \times 3.0 \mu\text{m}$ 의 단간균(短桿菌)~구균. 다형성 있음.
- [0052] 운동성 있음. 무포자. 그람 양성.
- [0053] (2) EYG 한천 배지, 27℃
- [0054] 간균(桿菌)~구균의 생육 사이클을 나타냄.
- [0055] <B: 배양 성질>
- [0056] (1) 육즙 한천 평판배양, 27℃
- [0057] 형상: 원형 크기는 3일간에서 1 내지 2mm.
- [0058] 주연(周緣): 전연(全緣)
- [0059] 융기: 반(半) 렌즈상
- [0060] 광택: 둔광(鈍光)
- [0061] 표면: 평활
- [0062] 색조: 불투명, 담황색
- [0063] (2) 육즙 한천 사면배양, 27℃
- [0064] 생육: 중(中) 정도
- [0065] 형상: 실 형상
- [0066] (3) 육즙 젤라틴 천자(穿刺) 배양, 27℃
- [0067] 액화하지 않음.
- [0068] <C: 생리학적 성질>
- [0069] (1) VP 시험: 음성
- [0070] (2) 인도의 생성: 음성
- [0071] (3) 전분의 가수 분해: 양성

- [0072] (5) 색소의 생성: 가용성 색소의 생성은 없음.
- [0073] (6) 우레아제: 음성
- [0074] (7) 옥시다제: 양성
- [0075] (8) 카탈라제: 양성
- [0076] (9) 생육의 범위: pH 5.5 내지 10.0, 온도 15 내지 37℃
- [0077] (10) 산소에 대한 태도: 호기성
- [0078] (11) 세포벽의 주요 디아미노산: 리진
- [0079] (12) 세포벽의 펩티드글리칸형: 리진-알라닌
- [0080] (13) 세포벽의 N-아실형: 아세틸
- [0081] (14) 세포벽의 구성당: 갈락토오스, 글루코오스, 람노오스
- [0082] (15) 비타민의 요구성: 없음
- [0083] (16) DNA의 GC 함량: 70%
- [0084] (17) DNA-DNA 호몰로지: 아스로박터 글로비포르미스(ATCC8010)와의 사이에서 69.3%의 DNA-DNA 호몰로지를 나타냄.
- [0085] 이상의 균학적 성질에 근거하여, 문헌[Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 제2권(1986년)]을 참고로 해서, 공지 균과의 이동(異同)을 검토하였다. 그 결과, 이 균은 아스로박터 글로비포르미스(*Arthrobacter globiformis*)에 속하는 미생물인 것으로 판명되었다. 이들 결과로부터 본 발명자들은 이 균을 신규 미생물 아스로박터 글로비포르미스 M6으로 명명하고, 평성(平成) 15년(2003년) 8월 6일부로 일본 이바라키현 쓰쿠바시 동(東) 1정목 1번지 1 중앙 제6소재의 독립 행정법인 산업기술 종합 연구소 특허생물 기탁 센터에 기탁하여, 수탁 번호 FERM BP-8448로서 수탁되었다.
- [0086] 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소 산생능을 가진 미생물에는, 상기 균은 물론이거니와 그 변이주, 더욱 이는 환상 말토실 말토오스 생성효소 산생능을 가진 제조합체 미생물을 포함하는 기타의 미생물, 및 그것들의 변이주들도 포함된다.
- [0087] 본 발명의 DNA라 함은 상기 환상 말토실 말토오스 생성효소를 코드하는 것 전반을 의미한다. 본 발명의 DNA는 환상 말토실 말토오스 생성효소를 코드하는 것인 한, 그것이 천연 유래의 것이어도 좋고 인위적으로 합성된 것이어도 좋다. 천연의 공급원으로서, 예를 들면, 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)을 포함하는 아스로박터 속 미생물을 들 수 있고, 이들 균체로부터 본 발명의 DNA를 포함하는 유전자 DNA를 얻을 수 있다. 즉, 이와 같은 미생물을 영양 배지에 접종하고, 호기적 조건하에서 약 1 내지 3일간 배양 후, 배양물로부터 균체를 채취하여 리소자임이나 β -글루카나아제 등의 세포벽 용해 효소나 초음파로 처리함으로써 이 DNA를 포함한 유전자 DNA를 균체 밖으로 용출시킨다. 이때, 프로테아제 등의 단백질 분해 효소를 병용하거나, SDS 등의 계면 활성제를 공존시키거나 동결 용해해도 좋다. 이와 같이 하여 얻어지는 처리물에, 예를 들면, 페놀 추출, 알코올 침전, 원심분리, 리보뉴클레아제 처리 등의 통상적인 방법을 적용하면 목적으로 하는 유전자 DNA가 얻어진다. 본 발명의 DNA를 인위적으로 합성하기 위해서는, 예를 들면, 서열표에서의 서열번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열에 근거해서 화학합성하면 좋다. 또한, 이 DNA를 포함하는 유전자 DNA를 주형으로 하고, 적당한 프라이머가 되는 화학합성 DNA를 이용해서 PCR 합성하는 것도 유리하게 실시할 수 있다.
- [0088] 본 발명의 DNA는, 통상, 소정의 염기서열을 가지고 있는데, 그 한가지 예를 들면, 서열표에서의 서열번호 3으로 나타내어지는 염기서열 또는 거기에 상동적인 염기서열을 들 수 있다. 서열표에서의 서열번호 3으로 나타내어지는 염기서열에 상동적인 염기서열을 가진 변이체 DNA로서는, 코드하는 효소의 활성을 유지하는 범위에서, 서열번호 3으로 나타내어지는 염기서열에서 1개 또는 2개 이상의 염기가 결실, 치환 혹은 부가한 염기서열을 가진 것을 들 수 있고, 서열번호 3으로 나타내어지는 염기서열에 대하여, 통상, 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 보다 더욱 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 가진 염기서열을 가진 것이 적합하다. 또한, 유전자 코드의 축중(縮重)에 근거하여, 그 코드하는 효소의 아미노산 서열을 변경하지 않고 염기의 1개 또는 2개 이상을 다른 염기로 치환한 것도 당연히 본 발명의 DNA에 포함된다.

- [0089] 본 발명의 DNA를 자율 복제가능한 적당한 벡터에 삽입해서 재조합 DNA로 하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 재조합 DNA는, 통상, DNA와 자율 복제가능한 벡터로 되어 있고, DNA를 입수할 수 있으면, 통상적인 방법인 재조합 DNA 기술에 의해 비교적 용이하게 제조할 수 있다.
- [0090] 이와 같은 벡터의 예로서는, pBR322, pUC18, Bluescript II SK(+), pUB110, pTZ4, pC194, pHV14, Trp7, YEp7, pBS7 등의 플라스미드 벡터나 λ gt? λ C, λ gt? λ B, p11, ϕ 1, ϕ 105 등의 파아지 벡터를 들 수 있다. 이 중에서, 본 발명의 DNA를 대장균에서 발현시키기 위해서는, pBR322, pUC18, Bluescript II SK(+), λ gt? λ C 및 λ gt? λ B가 적합하고, 한편, 고초균으로 발현시키기 위해서는, pUB110, pTZ4, pC194, p11, ϕ 1 및 ϕ 105가 적합하다.
- [0091] pHV14, Trp7, YEp7 및 pBS7은 재조합 DNA를 2종 이상의 숙주 내에서 복제시킬 경우에 유용하다. DNA를 이와 같은 벡터에 삽입하기 위해서는 이 분야에서 통상적으로 일반적인 방법이 채용된다. 구체적으로는, 우선, DNA를 포함하는 유전자 DNA와 자율 복제가능한 벡터를 제한 효소 및/또는 초음파에 의해 절단하고, 이어서, 생성한 DNA 단편과 벡터 단편을 연결한다. 유전자 DNA 및 벡터의 절단에 뉴클레오티드에 특이적으로 작용하는 제한 효소, 특히 II형의 제한 효소, 상세히는, Sau 3AI, Eco RI, Hind III, Bam HI, Sal I, Xba I, Sac I, Pst I 등을 사용하면, DNA 단편과 벡터 단편을 연결하는 것이 용이하다. 필요에 따라서, 양자를 어닐링한 후, 생체내 또는 생체외에서 DNA 리가제를 작용시키면 좋다. 이와 같이 하여 얻어지는 재조합 DNA를 적당히 숙주에 도입해서 형질 전환체로 하고, 이것을 배양함으로써 무한히 복제가능하다.
- [0092] 이렇게 하여 얻어지는 재조합 DNA는 대장균, 고초균, 방선균, 효모를 비롯한 적당한 숙주 미생물에 도입할 수 있다. 형질 전환체를 취득하기 위해서는, 콜로니 하이브리다이제이션법을 적용하거나, 글루코오스 중합도가 3 이상인 α -1,4 글루칸을 함유하는 영양 배지에서 배양하고, 그 당질로부터 환상 말토실 말토오스를 생성하는 것을 선택하면 좋다.
- [0093] 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소 산생능을 가진 형질 전환체도 포함한 미생물의 배양에 이용하는 배지는, 미생물을 생육할 수 있고, 환상 말토실 말토오스 생성효소를 산생할 수 있는 영양 배지이면 좋은데, 합성 배지 및 천연 배지의 어느 것이라도 좋다. 탄소원으로서, 미생물이 생육에 이용할 수 있는 것이면 좋은데, 예를 들면, 식물 유래의 전분이나 피토크리코젠, 동물이나 미생물 유래의 글리코젠이나 폴룰란, 또한 이들의 부분 분해물이나 글루코오스, 프룩토오스, 락토오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 당밀 등의 당질, 또한 시트르산, 숙신산 등의 유기산도 사용할 수 있다.
- [0094] 배지에서의 이들 탄소원의 농도는 탄소원의 종류에 따라 적당히 선택할 수 있다. 질소원으로서, 예를 들면, 암모늄염, 질산염 등의 무기 질소 화합물 및, 예를 들면, 요소(尿素), 콘 스티이프 리커, 카제인, 펩톤, 효모 엑스(extract), 육류 엑스 등의 유기 질소 함유물을 적당히 이용할 수 있다. 또한 무기 성분으로서, 예를 들면, 칼슘염, 마그네슘염, 칼륨염, 나트륨염, 인산염, 망간염, 아연염, 철염, 구리염, 몰리브덴염, 코발트염 등의 염류를 적당히 이용할 수 있다. 더욱이, 필요에 따라서 아미노산, 비타민 등도 적당히 이용할 수 있다.
- [0095] 배양은, 통상, 온도 15 내지 37℃에서 pH 5.5 내지 10의 범위, 바람직하게는 온도 20 내지 34℃에서 pH 5.5 내지 8.5의 범위로부터 선택되는 조건에서 호기적으로 실시된다. 배양 시간은 이 미생물이 증식할 수 있는 시간이면 좋은데, 바람직하게는 10시간 내지 150시간이다. 또한 배양 조건에서의 배양액의 용존(溶存) 산소 농도에는 특히 제한은 없지만, 통상적으로는 0.5 내지 20ppm이 바람직하다. 따라서 통기량을 조절하거나, 교반하거나 하는 등의 수단을 적당히 채용한다. 또한, 배양 방식은 회분(回分) 배양 또는 연속 배양의 어느 것이라도 좋다.
- [0096] 이렇게 하여 환상 말토실 말토오스 생성효소 산생능을 가진 미생물을 배양한 후, 본 발명의 효소를 함유하는 배양물을 회수한다. 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성은, 배양 미생물이 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)인 경우, 주로 배양물의 제균액(除菌液)에서 나타나는데, 제균액을 조(粗)효소액으로 해서 채취할 수도 있고, 배양물 전체를 조(粗)효소액으로 해서 이용할 수도 있다. 배양물로부터 균체를 제거하기 위해서는 통상적인 방법인 고액 분리법이 채용된다. 예를 들면, 배양물 그 자체를 원심분리하는 방법, 혹은 프리코우트 필터 등을 이용해서 여과분리하는 방법, 평막, 중공사(中空絲) 막 등의 막 여과에 의해 분리하는 방법 등이 적당히 채용된다. 제균액을 그대로 조(粗)효소액으로 해서 이용할 수 있지만, 일반적으로는 농축해서 이용한다. 농축법으로서, 황산 암모늄 염석법, 아세톤 및 알코올 침전법, 평막, 중공막(中空膜) 등을 이용한 막 농축법 등을 채용할 수 있다.
- [0097] 더욱이 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성을 가진 제균액 및 그 농축액을 사용하고, 환상 말토실 말토오스 생성효소를 이 기술분야에서 통상 사용되고 있는 적당한 방법에 의해 고정화할 수도 있다. 예를 들면, 이온 교환

체에의 결합법, 수지 및 막 등과의 공유결합법?흡착법, 고분자 물질을 이용한 포괄법 등을 적당히 채용할 수 있다.

[0098] 상기한 바와 같이 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는 조(粗)효소액을 그대로 또는 농축해서 이용할 수 있지만, 필요에 따라서, 이 기술분야에서 통상 사용되고 있는 적당한 방법에 의해 더욱 분리?정제해서 이용할 수도 있다. 예를 들면, 배양액의 상청 또는 과쇄 처리물을 황산 암모늄 염석해서 농축한 효소 표품(標品)을 투석 후, 『DEAE-토요퍼얼(Toyopearl) 650S』 수지를 이용한 음이온 교환 칼럼 크로마토그래피, 이어서 『페닐-토요퍼얼(Phenyl-Toyopearl) 650M』 수지를 이용한 소수 크로마토그래피를 이용해서 정제함으로써, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소를 전기 영동적으로 단일 밴드를 나타내는 정제 효소로 해서 얻을 수 있다.

[0099] 환상 말토실 말토오스 생성효소가 재조합형 효소일 경우에는, 숙주의 종류에 따라서는 균체 내에 효소가 축적할 경우가 있다. 이러한 경우에는, 균체 또는 배양물을 그대로 사용하는 것도 가능하지만, 통상적으로는 사용에 앞서, 필요에 따라서 침투압 쇼크나 계면 활성제에 의해 균체로부터 추출한 후, 또는 초음파나 세포벽 용해 효소에 의해 균체를 파쇄한 후, 여과, 원심분리 등에 의해 재조합형 효소를 균체 또는 균체 파쇄물로부터 분리해서 이용하는 것도 유리하게 실시할 수 있다.

[0100] 이렇게 하여 얻어지는 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는 글루코오스 중합도가 3 이상인 α -1,4 글루칸에 작용하여, 사이클로{ $\rightarrow 6$ }- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)}의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스를 생성한다. 이 효소는 글루코오스 중합도가 3 이상인 α -1,4 글루칸에 작용하여 분자 사이에서 α -말토실 전이반응함으로써, 비환원성 말단 글루코오스의 6위치에 α -말토실 잔기가 결합한 6- α -말토실- α -1,4 글루칸을 생성하고, 이것을 환상화함으로써, 사이클로{ $\rightarrow 6$ }- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)}의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스를 생성한다고 추측된다. 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는, 구체적으로는 아래의 이화학적 성질을 가질 경우가 있다.

[0101] (1) 분자량

[0102] SDS-겔 전기 영동법에서, $72,000 \pm 20,000$ 달톤.

[0103] (2) 등전점

[0104] 앰플라인 함유 등전점 전기 영동법에서, pI 3.6 ± 0.5 .

[0105] (3) 최적 온도

[0106] pH 6.0, 30분간 반응의 조건하에서, 50℃ 내지 55℃.

[0107] (4) 최적 pH

[0108] 40℃에서 30분간 반응의 조건하에서, pH 5.5 내지 6.5.

[0109] (5) 온도 안정성

[0110] pH 6.0, 60분간 유지의 조건하에서, 30℃까지 안정.

[0111] 1mM 칼슘 이온 존재 하에서는 50℃까지 안정.

[0112] (6) pH 안정성

[0113] 4℃에서 24시간 유지의 조건하에서, pH 5.0 내지 9.0에서 안정.

[0114] (7) N 말단 아미노산 서열

[0115] 서열표에서의 서열번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열, 즉, 아스파라긴산-프롤린-트레오닌-트레오닌-세린의 아미노산 서열을 가짐.

[0116] 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 기질이 되는 글루코오스 중합도 3 이상인 α -1,4 글루칸으로서는, 전분, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 글리코젠 등이나, 그것들을 아밀라아제 또는 산 등에 의해 부분적으로 가수 분해하여 얻어지는 아밀로텍스트린, 말토텍스트린, 말토올리고당 등의 부분 분해물을 들 수 있다. 아밀라아제에 의해 분해한 부분 분해물로서는, 예를 들면, 문헌[Handbook of Amylases and Related Enzymes, 1988년], 퍼가몬 프레스사(동경)]에 기재되어 있는 α -아밀라아제(EC 3.2.1.1), 말토테트라오스 생성 아밀라아제(EC 3.2.1.60), 말토펜타오스 생성 아밀라아제, 말토희사오스 생성 아밀라아제(EC 3.2.1.98) 등의 아밀라아제를 이

용해서 전분, 아밀로오스, 아밀로펙틴, 글리코젠 등을 분해해서 얻어지는 부분 분해물을 이용할 수 있다. 더욱이, 부분 분해물을 제조할 때, 폴룰라나아제(EC 3.2.1.41), 이소아밀라아제(EC 3.2.1.68) 등의 전분 지절(枝切) 효소를 작용시키는 것도 마음대로이다.

[0117] 기질로서의 전분은, 예를 들면, 옥수수, 밀, 쌀 등에서 유래하는 지상(地上) 전분이어도 좋고, 또한 감자, 고구마, 타피오카 등에서 유래하는 지하(地下) 전분이어도 좋으며, 바람직하게는 전분을 호화(糊化) 및/또는 액화한 용액으로 하여 사용된다. 그 전분의 부분 분해의 정도는 낮을수록 환상 말토실 말토오스 생성률이 높아지기 때문에, DE 약 20 이하, 바람직하게는 약 12 이하, 더욱 바람직하게는 약 5 이하의 부분 분해물이 적합하다. 또한 본 명세서에서 말하는 환상 말토실 말토오스 생성물이라 함은, 환상 말토실 말토오스 생성률(%) = {(생성한 환상 말토실 말토오스의 질량)/(반응액 중의 전체 당질의 질량)} × 100의 식으로 산출되는 값을 의미한다.

[0118] 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소를 기질에 작용시킬 때에는, 그 기질 농도는 특히 한정되지 않는데, 예를 들면, 기질 농도 0.1%(w/v)의 비교적 저농도의 용액을 사용한 경우라도, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 반응은 진행하여 환상 말토실 말토오스를 생성한다. 공업적으로는, 기질 농도 1%(w/v) 이상이 적합하고, 이 조건하에서 환상 말토실 말토오스를 유리하게 생성할 수 있다. 또한 기질 용액으로서, 완전히 끝까지 용해하지 않는 불용성의 기질을 함유하는 고농도의 기질 용액이어도 좋다. 반응 온도는 반응이 진행되는 온도, 즉 60℃ 부근까지에서 실시하면 좋다. 바람직하게는 30 내지 50℃ 부근의 온도를 이용한다. 반응 pH는, 통상, 5 내지 9의 범위, 바람직하게는 pH 5 내지 7의 범위로 조정하는 것이 좋다. 효소의 사용량과 반응 시간은 밀접하게 관계되어 있는데, 목적으로 하는 효소반응의 진행에 따라 적당히 선택하면 좋다.

[0119] 예를 들면, 기질 농도 1%(w/v)의 전분 또는 그 부분 분해물이나 아밀로오스의 수용액에 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소를 작용시킴으로써, 전분 또는 그 부분 분해물로부터는 약 30% 이상, 아밀로오스로부터는 약 44%의 높은 환상 말토실 말토오스 생성률로 본 발명의 환상 말토실 말토오스를 얻을 수 있다. 이 환상 말토실 말토오스 생성효소에 의한 환상 말토실 말토오스의 생성 메커니즘은 아래와 같이 추측된다.

[0120] 1) 이 효소는, 기질로서 글루코오스 중합도가 3 이상인 α-1,4 글루칸에 작용하여, 그 비환원성 말단의 말토실 잔기를 다른 분자의 비환원성 말단 글루코오스 잔기의 6위치 히드록실기로 전이하는 분자 간의 6-α-말토실 전이를 촉매하여, 비환원 말단에 6-α-말토실기를 가진, 글루코오스 중합도가 2 증가한 6-α-말토실-α-1,4 글루칸과, 글루코오스 중합도가 2 감소한 α-1,4 글루칸을 생성한다.

[0121] 2) 또한 이 효소는 6-α-말토실-α-1,4 글루칸에 작용하여 환상화 반응을 촉매하여, 사이클로{→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→}의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스와, 6-α-말토실-α-1,4 글루칸으로부터 세어서 글루코오스 중합도가 4 감소한 α-1,4 글루칸을 생성한다.

[0122] 3) 상기 1) 및 2)에서 새롭게 생긴 α-1,4 글루칸은, 다시, 1)로부터 2)의 반응을 반복으로써, 환상 말토실 말토오스를 생성한다.

[0123] 또한 이 환상 말토실 말토오스 생성반응시에, 다른 효소를 추가로 동시 병용하여 환상 말토실 말토오스 생성률을 향상시키는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 예를 들면, 전분에, 환상 말토실 말토오스 생성효소와 이소아밀라아제 등의 전분 지절 효소를 동시 병용해서 작용시킴으로써, 환상 말토실 말토오스의 생성률을 더욱 향상시키는 것도 유리하게 실시할 수 있다.

[0124] 상기의 반응에 의해 얻어진 반응액은 그대로 환상 말토실 말토오스 함유 당액으로서 이용할 수도 있다. 또한 필요에 따라서, 환상 말토실 말토오스 함유 당액에, α-아밀라아제, β-아밀라아제, 글루코아밀라아제 및 α-글루코시다아제로부터 선택되는 1종 또는 2종 이상을 작용시켜서, 협잡 올리고당을 가수 분해한 환상 말토실 말토오스 함유 당액으로 해서 사용할 수도 있다. 일반적으로는, 환상 말토실 말토오스 함유 당액을 더욱 정제해서 사용한다. 정제 방법으로서, 당의 정제에 이용되는 통상적인 방법을 적당히 채용하면 좋고, 예를 들면, 활성탄에 의한 탈색, H형, OH형 이온 교환 수지에 의한 탈염, 이온 교환 칼럼 크로마토그래피, 활성탄 칼럼 크로마토그래피, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피 등의 칼럼 크로마토그래피에 의한 분획, 알코올 및 아세톤 등의 유기용매에 의한 분별, 적당한 분리 성능을 가진 막에 의한 분리, 더욱이는 환상 말토실 말토오스를 이용하지 않고 협잡 당질을 자화(資化), 분해하는 미생물, 예를 들면 효모 등에 의한 발효 처리나 알칼리 처리 등에 의해, 잔존해 있는 환원성 당질을 분해 제거하는 등의 1종 또는 2종 이상의 정제 방법을 적당히 채용할 수 있다.

[0125] 특히, 공업적 대량생산 방법으로서, 이온 교환 칼럼 크로마토그래피의 채용이 적합하고, 예를 들면, 일본국 특개소58-23799호 공보, 일본국 특개소58-72598호 공보 등에 개시되어 있는 강산성 캐티온(cation) 교환 수지

를 이용하는 칼럼 크로마토그래피에 의해 협잡 당류를 제거하여, 목적물의 함량을 향상시킨 환상 말토실 말토오스 또는 이것을 함유하는 당질을 유리하게 제조할 수 있다. 이때, 고정상(固定床) 방식, 이동상(移動床) 방식, 의사(擬似) 이동상 방식 중의 어떠한 방식을 채용하는 것도 마음대로이다.

[0126] 이렇게 하여 얻어진 환상 말토실 말토오스를 함유하는 수용액, 또는 그 함량을 향상시킨 당질 수용액은, 통상, 환상 말토실 말토오스를, 고형물당 10 질량% 이상, 바람직하게는 40 질량% 이상 함유하는 당질 수용액인데, 통상, 이것을 농축하여 시럽상 제품으로 한다. 이 시럽상 제품을 더욱 건조해서 분말상 제품으로 하는 것도 마음대로이다.

[0127] 환상 말토실 말토오스의 결정을 제조하기 위해서는, 예를 들면, 고형물당(當)의 환상 말토실 말토오스 순도 약 50% 이상, 농도 약 5 내지 90 질량%의 환상 말토실 말토오스 함유액을 결정 석출기에 넣고, 고형물당 0.1 내지 20 질량%의 종(種)결정 공존 하에서, 온도 95℃ 이하, 바람직하게는 10 내지 90℃의 범위에서 교반하면서 서냉(徐冷)하여 환상 말토실 말토오스의 결정을 함유하는 매스키트를 제조한다. 매스키트로부터 환상 말토실 말토오스의 결정을 제조하는 방법으로서 분밀(分蜜)을 들 수 있고, 또한 환상 말토실 말토오스의 꿀 함유 결정을 제조하는 방법으로서, 예를 들면, 블록 분쇄, 유동 조립(造粒), 분무 건조 등의 공지의 방법을 들 수 있다. 이렇게 하여 제조되는 본 발명의 환상 말토실 말토오스의 결정 또는 꿀 함유 결정은 상품(上品)이고, 저(低)감미를 가진 비환원성의 백색 분말이며, 안정한 당질이므로, 다른 소재(素材), 특히 아미노산, 올리고펩티드, 단백질 등의 아미노산을 가진 물질과 혼합, 가공해도 갈변하는 일도 없고, 이상한 냄새를 발생하는 일도 없으며, 혼합한 다른 소재를 손상하는 일도 적다.

[0128] 또한, 본 발명의 환상 말토실 말토오스는 포접(包接) 능력을 가지고 있어, 포접한 향기성분, 유효성분 등의 휘산, 품질 열화를 방지하므로, 향기성분, 유효성분의 안정화 유지에 극히 우수하다. 이 경우, 필요에 따라서, 사이클로텍스트린류, 분기(分岐) 사이클로텍스트린류, 본 출원인이 국제공개 WO 01/90338 A1호 명세서, 국제공개 WO 02/055708 A1호 명세서, 국제공개 WO 02/40659 A1호 명세서에서 개시한 사이클로(→6)- α -D-글루코피라노실-(1→3)- α -D-글루코피라노실-(1→6)- α -D-글루코피라노실-(1→3)- α -D-글루코피라노실-(1→)의 구조를 가진 환상 4당, 분기 환상 4당류, 사이클로텍스트린류, 사이클로프락탄류 등의 기타의 환상 당질을 병용함으로써, 포접 능력에 의한 안정화를 강화하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 사이클로텍스트린류 등의 환상 당질로서는, 고순도의 것에 한정할 필요는 없고, 저순도의 환상 당질, 예를 들면, 다량의 말토텍스트린과 함께 각종 환상 당질을 함유한 전분 부분 분해물 등도 유리하게 이용할 수 있다.

[0129] 더욱이 본 발명의 환상 말토실 말토오스는 아밀라아제나 α -글루코시다아제에 의해 실질적으로 분해되지 않으므로, 경구 섭취해도 소화 흡수되지 않고, 또한 장 내 세균에 의해 발효되기 어려우며, 극히 저칼로리의 당질이어서 수용성 식물(食物) 섬유와 유사한 물질로서 이용할 수 있다. 본 발명의 환상 말토실 말토오스가 분말제품인 경우에는, 이것 자체의 흡습성이 낮고, 부착, 고결(固結)하기 어려울 뿐만 아니라, 다른 분말과 혼합해서 얻어지는 분말상물의 부착, 고결을 방지할 수도 있다. 더욱이 환상 말토실 말토오스 자체는 무독, 무해한 신유의 감미료이다.

[0130] 또한, 본 발명의 환상 말토실 말토오스는 안정한 감미료이므로, 결정 제품인 경우에는, 폴룰란, 히드록시에틸스타치, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제와 병용해서 정제나 당의정으로 해서 이용하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 그리고 침투압 조절성, 부형성, 광택 부여성, 보습성, 점성, 기타의 당의 결정 방지성, 난(難)발효성 등의 성질을 구비하고 있다.

[0131] 따라서 본 발명의 환상 말토실 말토오스, 또는 이것을 함유하는 당질은 감미료, 정미 개량제, 품질 개량제, 안정제, 변색 방지제, 부형제 등으로 해서, 음식물, 기호물, 사료, 이료(餌料), 화장품, 의약품 등의 각종 조성물에 유리하게 이용할 수 있다.

[0132] 본 발명의 환상 말토실 말토오스, 또는 이것을 함유하는 당질은, 그대로 단맛 부여를 위한 조미료로서 사용할 수 있다. 필요하다면, 예를 들면, 가루엣, 포도당, 이성화당, 설탕, 맥아당, 트레할로오스, 벌꿀, 메이플 슈거, 소르비톨, 말티톨, 디히드로칼콘, 스테비오시드, α -글리코실스테비오시드, 라칸카 감미물, 글리시르리진, 소마틴, 수크랄로오스, L-아스파르틸페닐알라닌메틸 에스테르, 사카린, 글라이신, 알라닌 등과 같은 기타의 감미료와, 또한 텍스트린, 전분, 락토오스 등과 같은 증량제와 혼합해서 사용할 수도 있다.

[0133] 또한, 본 발명의 환상 말토실 말토오스, 또는 이것을 함유하는 당질의 분말상 제품은, 그대로, 또는 필요에 따라서, 증량제, 부형제, 결합제 등과 혼합하여, 과립, 구상(球狀), 단봉상, 판상, 입방체, 정제 등 각종 형상으로 성형해서 사용하는 것도 마음대로이다.

- [0134] 그리고 본 발명의 환상 말토실 말토오스, 또는 이것을 함유하는 당질의 단맛은, 신맛, 짠맛, 떼은맛, 감미로운 맛, 쓴맛 등의 다른 정미를 가진 각종의 물질과 잘 조화하고, 내산성, 내열성도 크므로, 일반의 음식물의 단맛 부여, 정미 개량에, 또한 품질 개량 등에 유리하게 이용할 수 있다.
- [0135] 예를 들면, 간장, 분말 간장, 된장, 분말 된장, 모로미, 히시오, 후리카케, 마요네즈, 드레싱, 식초, 초간장, 초밥용 분말 초, 중화요리 프리믹스, 텐즈유, 멘즈유, 소스, 케첩, 불고기 양념, 커리 루우, 스튜 프리믹스, 수프 프리믹스, 우려낸 국물 프리믹스, 복합 조미료, 미린, 신미린, 테이블 슈거, 커피 슈거 등의 각종 조미료에 대한 감미료, 더욱이는 정미 개량제, 품질 개량제 등으로서 사용하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 또한, 예를 들면, 샌베이, 아라레, 오코시, 규히, 떡, 만두, 우이로, 팔소류, 양갱, 물양갱, 긴교쿠, 젤리, 카스테라, 눈깔 사탕 등의 각종 일본식 과자, 빵, 비스킷, 크래커, 쿠키, 파이, 푸딩, 버터 크림, 커스터드 크림, 슈크림, 와플, 스펀지 케이크, 도넛, 초콜릿, 츄잉검, 캐러멜, 누가, 캔디 등의 각종 양과자, 아이스크림, 샤베트 등의 빙과, 과실의 시럽 절임, 얼음 꿀 등의 시럽류, 플라워 페이스트, 땅콩 페이스트, 프루츠 페이스트 등의 페이스트류, 잼, 마말레이드, 시럽 절임, 당과 등의 과실, 야채의 가공 식품류, 후쿠진 츠케, 베타라 츠케, 센마이 츠케, 랫코 츠케 등의 절인 야채류, 단무지 프리믹스, 배추절임 프리믹스 등의 절인 야채 프리믹스, 햄, 소세지 등의 축육(畜肉) 제품류, 어육 햄, 어육 소세지, 어묵, 치쿠와, 튀김 등의 어육제품, 성게, 오징어의 젓갈, 수콘부, 말린 오징어, 미린 도포 복어 말림, 대구, 도미, 새우 등의 썬 생선의 잘게 찢은 조리식품 등의 각종 진미류, 김, 산채, 말린 오징어, 작은 물고기, 조개 등으로 제조되는 해산물 조림류, 콩자반, 포테이토 샐러드, 다시마 말이 등의 반찬식품, 유(乳)제품, 어육, 축육(畜肉), 과실, 야채의 병조림, 통조림류, 합성주, 증양주, 청주, 과실주, 발포주, 맥주 등의 주류, 커피, 코코아, 주스, 탄산 음료, 락트산 음료, 유산균 음료 등의 청량음료수, 푸딩 믹스, 핫케이크 믹스, 즉석 주스, 즉석 커피, 즉석 팔죽, 즉석 수프 등의 즉석 식품, 더욱이는 이 유식, 치료식, 드링크제, 펩티드 식품, 냉동 식품 등의 각종 음식물에 대한 단맛 부여에, 정미 개량에, 품질 개량 등에 유리하게 실시할 수 있다.
- [0136] 또한, 가축, 가금, 기타의 꿀벌, 누에, 물고기 등의 사육 동물을 위한 사료, 이료 등의, 기호성을 향상시킬 목적으로 사용할 수도 있다. 그 외에, 담배, 치약, 입술 연지, 립 크림, 내복액, 정제, 트로치, 간유 드롭, 입안 청량제, 입안 향기제, 양치질제 등의 각종 고형물, 페이스트상, 액상 등으로 하여 기호물, 화장품, 의약품 등의 각종 조성물에 대한 감미제로서, 또는 정미 개량제, 교미제(矯味劑)로서, 더욱이 품질 개량제, 안정제 등으로서 유리하게 이용할 수 있다.
- [0137] 품질 개량제, 안정제로서는, 유효성분, 활성 등을 상실하기 쉬운 각종 생리활성 물질 또는 이것을 함유하는 건강식품, 기능성 식품, 의약품 등에 유리하게 적용할 수 있다. 예를 들면, 인터페론- α , - β , - γ , 종양 괴사 인자- α , - β , 매크로파아지 유주(遊走) 저지 인자, 콜로니 자극 인자, 트랜스퍼 팩터, 인터류킨 II 등의 림포카인 함유액, 인슐린, 성장 호르몬, 프롤락틴, 에리트로포이에틴, 난세포 자극 호르몬 등의 호르몬 함유액, BCG 백신, 일본 뇌염 백신, 홍역 백신, 폴리오 생(生) 백신, 두묘, 파상풍 독소이드, 허브 향독소, 인간 면역 글로불린 등의 생물제제 함유액, 페니실린, 에리트로마이신, 클로람페니콜, 테트라사이클린, 스트렙토마이신, 황산가나마이신 등의 항생 물질 함유액, 티아민, 리보플라빈, L-아스코르브산, 간유, 카로티노이드, 에르고스테롤, 토코페롤 등의 비타민 함유액, EPA, DHA, 아라키 돈산 등의 고도 불포화 지방산 또는 그 에스테르 유도체, 리파아제, 에스테라아제, 우로키나아제, 프로테아제, β -아밀라아제, 이소아밀라아제, 글루카나아제, 락타아제 등의 효소 함유액, 약용 인삼 엑스, 자라 엑스, 클로렐라 엑스, 알로에 엑스, 프로폴스 엑스 등의 엑스류, 바이러스, 유산균, 효모 등의 생균 페이스트, 로얄 젤리 등의 각종 생리활성 물질도 그 유효성분과 활성을 상실함이 없고, 안정하며 품질이 높은 액상, 페이스트상 또는 고상(固狀)의 건강식품, 기능성 식품이나 의약품 등을 용이하게 제조할 수 있다.
- [0138] 이상 설명한 바와 같은 각종 조성물에, 환상 말토실 말토오스, 또는 이것을 함유하는 당질을 함유시키는 방법으로서, 그 제품이 완성될 때까지의 공정에서 함유시키면 좋은데, 예를 들면, 혼화, 혼날(混捏), 용해, 용해, 침지, 침투, 살포, 도포, 피복, 분무, 주입, 결정 석출, 고화 등의 공지의 방법이 적당히 선택된다. 그 양은, 통상적으로 0.1 질량% 이상, 바람직하게는 1 질량% 이상 함유시키는 것이 적합하다.
- [0139] 이하, 실험에 의해 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0140] <실험 1: 비환원성 당질의 제조>
- [0141] 진분 부분 분해물(상품명 『파인텍스 #4』, 일본국의 松谷 화학공업 주식회사 제조) 1.5w/v%, 효모 추출물(상품명 『폴리펩톤』, 일본국의 日本 제약 주식회사 제조) 0.5w/v%, 효모 추출물(상품명 『효모 엑스 S』, 일본국의 日本 제약 주식회사 제조) 0.1w/v%, 인산 2칼륨 0.1w/v%, 인산 1나트륨 2수화물 0.06w/v%, 황산 마그네슘 7수

화물 0.05w/v%, 탄산 칼슘 0.3w/v%, 및 물로 된 액체 배지를 500ml 용량의 삼각 플라스크 12개에 100ml씩 넣고, 오토클레이브에서 121℃에서 20분간 멸균하고, 냉각하였다. 이어서, 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)을 접종하고, 27℃에서 230rpm에서 120시간 회전 진탕 배양하였다. 배양 후, 배양액을 원심분리(8,000rpm, 20분간)해서 균체를 제거하고, 배양 상청(上清)(약 1.1L)을 얻었다. 얻어진 배양 상청 1L를 효소액으로서 사용하고, 이것을 2w/v% 가용성 전분 및 2mM 염화 칼슘을 함유하는 50mM 아세트산 완충액 1L에 첨가하고, 24시간 동안 40℃에서 반응시킨 후, 약 100℃에서 10분간 열처리함으로써 반응을 정지하였다.

[0142] 얻어진 반응물 중의 당질을 조사하기 위해서, 전개 용매로서 n-부탄올, 피리딘, 물 혼합액(용량비 6:4:1)을, 또한 박층 플레이트로서 메르크사제 『키젤겔 60』(알루미늄 플레이트, 10 × 20cm)을 사용하고, 2회 전개하는 실리카 겔 박층 크로마토그래피(이하, 간단히 "TLC"라 함)를 하여 당질을 분리하였다. 황산-메탄올법으로 발색시켜, 분리한 당질을 검출한 결과, 글루코오스(Rg값으로서 1.00), 말토오스(Rg값으로서 0.82) 외에, Rg값이 약 0.44인 당질 및 Rg값이 약 0.21인 당질이 검출되었다. 이들 당질은 아스로박터 글로비포르미스 M6의 배양 상청 중의 효소가 가용성 전분에 작용해서 생성한 것이라고 생각되었다. 또한 여기서 말하는 Rg값이라 함은, TLC에 있어서 글루코오스의 이동 거리에 대한 용질의 이동 거리의 비를 나타낸 것으로서, $Rg\text{값} = (\text{용질의 원점에서의 이동 거리}) / (\text{글루코오스의 원점에서의 이동 거리})$ 의 식으로 산출된다.

[0143] 이어서, 상기의 반응물을 염산으로 pH 5.0으로 조정하고, α-글루코시다아제(상품명 『트랜스글루코시다아제 L 「아마노」』, 일본국의 天野 엔자임 주식회사 제조)를 고형물 1 그램당 4000 단위 및 글루코아밀라아제(일본국의 나가세 생화학 공업 주식회사 판매)를 고형물 1 그램당 250 단위 첨가해서 50℃에서 16시간 반응시켰다. 반응 후, 약 100℃에서 10분간 열처리해서 반응을 정지시켰다. 얻어진 반응액 중의 당질을 TLC에 의해서 분석한 결과, 글루코오스 및 Rg값이 약 0.44인 당질만이 검출되고, 말토오스, Rg값이 약 0.21인 당질은 검출되지 않았다.

[0144] 이들 결과로부터, 말토오스 및 Rg값이 약 0.21인 당질은 α-글루코시다아제와 글루코아밀라아제에 의해 글루코오스로 분해되지만, Rg값이 약 0.44인 당질은 이들 효소에 의해 분해되지 않는 것이 판명되었다.

[0145] 이어서, 상기의 반응액에 수산화 나트륨을 첨가해서 pH를 12로 조정하고, 98℃에서 1시간 유지함으로써 환원당을 분해하였다. 불용물을 여과해서 제거한 후, 일본국의 三菱화학제 이온교환 수지 『다이아이온 SK-1B』와 『다이아이온 WA30』 및 오르가노제 음이온 교환 수지 『IRA411』을 사용해서 탈색, 탈염하고, 정밀 여과한 후, 에바포레이터에서 농축하고, 진공건조해서 고형물로 해서 약 4.0g의 당질 분말을 얻었다.

[0146] 얻어진 당질의 조성을 고속 액체 크로마토그래피법(이하, 간단히 "HPLC"라 함)으로 조사한 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 용출시간 10.61분에서 피크가 검출되고, 순도는 97% 이상으로서 극히 고순도인 것이 판명되었다. 그리고 HPLC는 칼럼에 『Shodex SUGAR KS-801』(일본국의 昭和電工 주식회사 제조)을 사용하고, 용리액으로서 물을 사용하여, 칼럼 온도 60℃, 유속 0.5ml/분의 조건에서 실시하고, 검출은 시차(示差) 굴절계 RI-8012(일본국의 토소 주식회사 제조)를 사용해서 하였다.

[0147] 얻어진 당질의 환원력을 소모기?넬슨법으로 측정한 결과, 그 환원력은 검출한계 이하이어서, 이 제품은 실질적으로 비환원성 당질인 것으로 판단되었다.

[0148] <실험 2: 비환원성 당질의 구조분석>

[0149] <실험 2-1: 질량분석>

[0150] 실험 1의 방법으로 얻어진 비환원성 당질에 대해서, 질량분석 장치 『LCQ Advantage』(서모 일렉트론사제)를 사용해서 질량분석한 결과, 질량수 671의 나트륨 부가 분자 이온이 현저하게 검출되어, 본 발명의 비환원성 당질의 질량수는 648인 것이 판명되었다.

[0151] <실험 2-2: 구성당 분석>

[0152] 실험 1의 방법으로 얻어진 비환원성 당질에 대해서, 통상적인 방법에 따라 황산을 사용해서 단당이 될 때까지 가수 분해하고, 가스 크로마토그래피법으로 구성당을 조사한 결과, D-글루코오스만이 검출되어, 본 발명의 비환원성 당질의 구성당은 D-글루코오스인 것이 판명되었다. 위에서 설명한 질량수를 고려하면, 본 발명의 비환원성 당질은 D-글루코오스 4 분자로 된 환상 당질인 것을 알 수 있었다.

[0153] <실험 2-3: 메틸화 분석>

[0154] 실험 1의 방법으로 얻어진 비환원성 당질에 대해서, 통상적인 방법에 따라 메틸화 분석을 하여 가스 크로마토그

래피법으로 메틸화물을 조사하였다. 그 결과를 표 1에 정리하였다.

표 1

[0155]

분석 메틸화물의 종류	비율
2,3,4-트리메틸화물	1.03
2,3,6-트리메틸화물	1.00

[0156]

표 1의 결과로부터 명확한 바와 같이, 2,3,4-트리메틸화물과 2,3,6-트리메틸화물이 거의 등량(等量)이기 때문에, 본 발명의 비환원성 당질을 구성하는 D-글루코오스 4 분자 중에서, 2 분자는 1위치와 6위치에서 글루코시드 결합해 있고, 또한 다른 2 분자는 1위치와 4위치에서 글루코시드 결합해 있는 것이 판명되었다.

[0157]

<실험 2-4: 핵자기 공명 분석>

[0158]

실험 1의 방법으로 얻어진 비환원성 당질에 대해서, 통상적인 방법에 따라 핵자기 공명(NMR) 분석을 하였다. ^1H -NMR 스펙트럼을 도 2에, ^{13}C -NMR 스펙트럼을 도 3에 나타냈다. 실험 2-1 및 2-2의 결과로부터, 이 비환원성 당질은 4 분자의 글루코오스로 된 당질인 것이 판명되었지만, ^{13}C -NMR 스펙트럼에서 탄소 시그널이 12개밖에 나타나지 않으므로, 이 비환원성 당질은 대칭의 구조를 가지고 있는 환상의 4당인 것이 판명되었다. 또한, ^1H -NMR 스펙트럼에서의 약 4.93ppm의 시그널 및 약 5.26ppm의 시그널은 D-글루코오스 잔기의 1위치 프로톤에 귀속되어, 그 스핀-스핀 결합 상수를 구한 결과, 약 3.309Hz(약 4.93ppm의 시그널) 및 약 3.677Hz(약 5.26ppm의 시그널)이었기 때문에, 1,4 글루코시드 결합해 있는 D-글루코오스 잔기의 1위치의 아노머형 및 1,6 글루코시드 결합해 있는 D-글루코오스 잔기의 1위치의 아노머형은 양쪽 모두 α 형인 것이 판명되었다.

[0159]

이상의 결과로부터, 본 발명의 비환원성 당질은, 도 4에 나타내는 환상 말토실 말토오스, 즉, 사이클로{ $\rightarrow 6$ }- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 6)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow 4)- α -D-글루코피라노실-(1 \rightarrow)의 구조를 가진 환상의 4당인 것이 판명되었다. 이 구조를 가진 당질은 지금까지 전혀 알려져 있지 않으므로, 본 발명의 환상 말토실 말토오스는 신규의 환상 당질이다.

[0160]

<실험 3: 환상 말토실 말토오스 생성효소의 생산>

[0161]

실험 1에 기재한 액체 배지를 500ml 용량의 삼각 플라스크 2개에 100ml씩 넣고, 오토클레이브에서 121℃에서 20분간 멸균하여, 냉각하고, 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)을 접종하여, 27℃에서 230rpm에서 48시간 회전 진탕 배양한 것을 종배양(種培養)으로 하였다.

[0162]

용량 30L의 퍼멘터에 종배양과 동일한 조성의 액체 배지를 약 20L 넣고, 가열 멸균, 냉각해서 온도 27℃로 한 후, 종배양액 약 200ml를 접종하고, 온도 27℃, pH 5.5 내지 8.0으로 유지하면서, 96시간 통기(通氣) 교반 배양하였다. 배양 후, 퍼멘터로부터 배양액을 뽑아내고, 원심분리(8,000rpm, 20분간)해서 균체를 제거하여 배양 상청 약 18L를 얻었다. 배양액 및 배양 상청에 대해서 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성을 측정한 결과, 배양액 중에는 이 효소 활성을 약 0.028 단위/ml 함유하고, 상청 중에는 이 효소 활성을 약 0.026 단위/ml 함유하는 것을 확인함으로써, 아스로박터 글로비포르미스 M6에 의해 생산되는 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는 그 대부분이 균체 외부에 존재하는 것이 판명되었다.

[0163]

<실험 4: 환상 말토실 말토오스 생성효소의 정제>

[0164]

실험 3에서 얻은 배양 상청 중에서 약 9.2L(총 활성 약 240 단위)에, 최종 농도 60% 포화가 되도록 황산 암모늄을 첨가하고, 4℃에서 24시간 방치함으로써 염석하였다. 생성한 염석 침전물을 원심분리(11,000rpm, 30분간)에 의해서 회수하고, 이것을 10mM 트리스-염산 완충액(pH 7.5)에 용해 후, 이 완충액에 대하여 투석하여 조(粗)효소액으로서 약 240ml를 얻었다. 조(粗)효소액 중의 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성은 약 0.83 단위/ml이었다(총 활성 약 200 단위). 이 조(粗)효소액을 일본의 토소 주식회사제 『DEAE-토요퍼알(Toyopearl) 650S』 겔을 사용한 음이온 교환 크로마토그래피(겔 용량 100ml)에 제공하였다. 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성은, 10mM 트리스-염산 완충액(pH 7.5)으로 평형화한 『DEAE-토요퍼알(Toyopearl) 650S』 겔에 흡착하고, 식염 농도 0M로부터 0.4M의 리니어 그래디언트(linear gradient)에서 용출시킨 결과, 식염 농도 약 0.22M 부근에서 용출하였다. 이 활성 회분을 회수하고, 최종 농도 1M이 되도록 황산 암모늄을 첨가해서 4℃에서 24시간 방치한 후, 원심분리해서 불용물을 제거하고, 일본의 토소 주식회사제 『페닐-토요퍼알(Phenyl-Toyopearl) 650M』

겔을 사용한 소수 크로마토그래피(겔 용량 10ml)에 제공하였다. 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성은, 1M 황산 암모늄을 함유하는 20mM 아세트산 완충액(pH 6.0)으로 평형화한 『페닐-토요퍼얼(Phenyl-Toyopearl) 650M』 겔에 흡착하고, 황산 암모늄 농도 1M로부터 0M의 리니어 그라디언트에서 용출시킨 결과, 황산 암모늄 농도 약 0.1M 부근에서 용출하였다. 이 정제의 각 스텝에서의 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성량, 환상 말토실 말토오스 생성효소 비활성(比活性) 및 수율을 표 2에 나타낸다.

표 2

[0165]

공정	환상 말토실 말토오스 생성효소 활성량 (단위)	환상 말토실 말토오스 생성효소 비활성 (단위/mg 단백질)	수율 (%)
배양 상청	240	0.13	100
황산 암모늄 염석 후의 투석액	200	0.66	83
이온 교환 칼럼 용출액	140	7.3	58
소수 칼럼 용출액	96	10	40

[0166]

소수 크로마토그래피 후의 정제한 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 5 내지 20w/v% 농도 기울기 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동에 의해 효소 표품의 순도를 검정한 결과, 단백질 밴드는 단일이어서, 순도가 높은 표품이었다.

[0167]

<실험 5: 환상 말토실 말토오스 생성효소의 성질>

[0168]

<실험 5-1: 분자량>

[0169]

실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법(5 내지 20w/v% 농도 기울기)에 제공하고, 동시에 영동한 분자량 마커(일본 바이오?랏도 라보라토리즈 주식회사제)와 비교해서 분자량을 측정한 결과, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 분자량은 72,000±20,000 달톤인 것이 판명되었다.

[0170]

<실험 5-2: 등전점>

[0171]

실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 2.2w/v% 앰폴라인(아머샴?바이오사이언스 사제) 함유 등전점 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법에 제공하고, 동시에 영동한 등전점 마커(아머샴?바이오사이언스 사제)와 비교해서 등전점을 구한 결과, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 등전점은 pI 3.6±0.5인 것이 판명되었다.

[0172]

<실험 5-3: 효소반응의 최적 온도 및 최적 pH>

[0173]

실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 사용하여, 효소 활성에 미치는 온도, pH의 영향을 이 효소의 활성 측정법에서의 온도, pH를 각각 변화시켜서 측정하였다. 이들 결과를 도 5(최적 온도), 도 6(최적 pH)에 나타냈다. 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 최적 온도는, pH 6.0, 30분간 반응의 조건하에서 50 내지 55℃이며, 최적 pH는, 40℃, 30분간 반응의 조건하에서 5.5 내지 6.5인 것이 판명되었다.

[0174]

<실험 5-4: 효소의 온도 안정성 및 pH 안정성>

[0175]

실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 사용하여 이 효소의 온도 안정성 및 pH 안정성을 조사하였다.

[0176]

온도 안정성은, 효소용액(10mM 아세트산 완충액, pH 6.0)을 염화 칼슘 비존재 하 또는 1mM 존재 하에서 각 온도에서 60분간 유지하고, 물로 냉각한 후, 잔존하는 효소 활성을 측정함으로써 구하였다. pH 안정성은, 이 효소를 각 pH 100mM 완충액 중에서 4℃에서 24시간 유지한 후, pH를 6.0으로 조정하고, 잔존하는 효소 활성을 측정함으로써 구하였다. 이들 결과를 도 7(온도 안정성), 도 8(pH 안정성)에 나타냈다. 도 7로부터 명확한 바와 같이, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 온도 안정성은, 염화 칼슘 비존재 하에서 30℃까지, 염화 칼슘 1mM 존재 하에서 50℃까지인 것이 밝혀져서, 칼슘 이온에 의해 이 효소의 온도 안정성이 향상하는 것을 알 수 있었다. 또한 도 8로부터 명확한 바와 같이, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 pH 안정성은 pH 5.0 내지

9.0의 범위인 것이 판명되었다.

[0177] <실험 5-5: 효소 활성에 미치는 금속염의 영향>

[0178] 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 사용하여, 효소 활성에 미치는 금속염의 영향을 농도 1mM의 각종 금속염 존재 하에서 활성측정의 방법에 준해서 조사하였다. 그 결과를 표 3에 나타낸다.

표 3

[0179]

금속염	상대활성 (%)	금속염	상대활성 (%)
무첨가	100	NiCl ₂	90
MgCl ₂	98	CuCl ₂	1
AlCl ₃	13	ZnCl ₂	73
CaCl ₂	99	SrCl ₂	90
MnCl ₂	97	BaCl ₂	90
FeCl ₂	95	HgCl ₂	2
FeCl ₃	32	PbCl ₂	36
CoCl ₂	95	EDTA	25

[0180] 표 3의 결과로부터 명확한 바와 같이, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성은 Cu²⁺ 및 Hg²⁺ 이온에 의해서 현저하게 저해되고, Al³⁺, Fe³⁺ 및 Pb²⁺ 이온에 의해서 저해되는 것도 밝혀졌다. 또한 금속 이온의 킬레이트제인 EDTA에 의해서도 저해되는 것도 밝혀졌다.

[0181] <실험 5-6: N 말단 아미노산 서열>

[0182] 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 사용하여 이 효소의 N 말단 아미노산 서열을 프로테인 시퀀서 모델 492HT(어플라이드 바이오시스템즈사제)를 이용해서 분석한 결과, 서열표에서의 서열번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열, 즉 아스파라긴산-프롤린-트레오닌-트레오닌-세린의 N 말단 아미노산 서열을 가지고 있는 것이 판명되었다.

[0183] <실험 5-7: 부분 아미노산 서열>

[0184] 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 적당량 취하고, 10mM 트리스-염산 완충액(pH 9.0)에 대하여 4℃에서 18시간 투석한 후, 이 완충액을 가해서 단백질 농도 약 1mg/ml로 하였다. 이 용액을 약 1ml 취하고, 리실 엔도펩티다아제(일본국의 和光純藥 주식회사 판매) 20μg을 가해서 30℃에서 16시간 유지하여 효소 단백질을 가수 분해하였다. 가수 분해물을, 미리 8%(v/v) 아세트니트릴을 함유하는 0.1%(v/v) 트리플루오로아세트산으로써 평형화시켜 둔 HPLC용 칼럼(상품명 『마이크로본다팩 C18』, 지름 3.9mm × 길이 150mm, 워터스사제)에 주입하고, 유속 0.9ml/분, 실온의 조건 하에서, 0.1%(v/v) 트리플루오로아세트산-8%(v/v) 아세트니트릴 용액으로부터 0.1%(v/v) 트리플루오로아세트산-40%(v/v) 아세트니트릴 용액의 120분간의 리니어 그래디언트에서 통액(通液)하여 펩티드 단편을 분획(分劃)하였다. 칼럼으로부터 용출한 펩티드 단편은 파장 210nm의 흡광도를 측정함으로써 검출하였다. 통액 개시로부터 약 12분, 약 18분, 약 20분, 약 36분, 약 39분 및 약 66분에서 용출한 6종의 펩티드 단편의 아미노산 서열을 각각 실험 5-6과 동일한 방법에 의해서 분석한 결과, 각각 서열표에서의 서열번호 4 내지 9에 나타낸 아미노산 서열을 가지고 있었다.

[0185] <실험 6: 환상 말토실 말토오스 생성효소를 코드하는 DNA의 클로닝 및 이것을 함유하는 재조합 DNA와 형질 전환체의 제조>

[0186] 환상 말토실 말토오스 생성효소를 코드하는 DNA를 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)으로부터 클로닝하여, 자율 복제가능한 재조합 DNA의 제작, 효소를 코드하는 DNA의 염기서열의 결정, 및 형질 전환체의 제조를 실시하였다.

[0187] <실험 6-1: 염색체 DNA의 제조>

[0188] 전분 부분 분해물(상품명 『파인텍스 #4』, 일본국의 松谷화학공업 주식회사 제조) 2.0w/v%, 효모 추출물(상품명 『아사히 미스토』, 아사히 후도 안도 헬스케어 주식회사 판매) 1.0w/v%, 인산 2칼륨 0.1w/v%, 인산 1나트륨?12수염(水鹽) 0.06w/v%, 황산 마그네슘?7수염 0.05w/v% 및 물로 된 액체 배지를 500ml 용량의 삼각 플라스크에 100ml씩 넣고, 오토클레이브에서 121℃에서 20분간 멸균하여 냉각하고, 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)을 접종하여 27℃에서 230rpm에서 24시간 회전 진탕 배양하였다.

[0189] 원심분리에 의해 배양물로부터 채취한 균체를 TES 완충액(pH 8.0)에 부유시키고, 리소자임을 0.05%(w/v) 가하여, 37℃에서 30분간 인큐베이트하였다. 처리물을 -80℃에서 1시간 동결 후, TSS 완충액(pH 9.0)을 가해서 60℃로 가온하고, TES 완충액/페놀 혼합액을 가하여 얼음물 중에서 냉각하면서 5분간 격렬하게 진탕한 후, 원심분리에 의해 상청을 채취하였다. 이 상청에 2배 체적의 냉(冷) 에탄올을 가하여, 침전한 조(粗)염색체 DNA를 채취하고, SSC 완충액(pH 7.1)에 용해 후, 리보뉴클레아제와 프로테이나아제를 각각 7.5μg과 125μg 가하고, 37℃에서 1시간 유지해서 반응시켰다. 반응물에 클로로포름/이소아밀 알코올 혼합액을 첨가해서 염색체 DNA를 추출하고, 냉 에탄올을 가하여, 생성한 염색체 DNA를 함유하는 침전을 채취하였다. 이렇게 하여 얻은 정제 염색체 DNA를 농도 약 1mg/ml가 되도록 SSC 완충액(pH 7.1)에 용해하고, -80℃에서 동결하였다.

[0190] <실험 6-2: 재조합 DNA pBMB1과 형질 전환체 BMB1의 제조>

[0191] 실험 6-1에서 제조한 정제 염색체 DNA 용액을 0.1ml 취하고, 여기에 제한 효소 Bam HI를 약 100 단위 첨가하고, 37℃에서 1시간 반응시켜 염색체 DNA를 가수 분해한 후, 아가로오스 전기 영동법에 의해 약 3,000 내지 6,000 염기쌍으로 된 DNA 단편을 채취하였다. 별도로, 플라스미드 벡터(스트라타진 클로닝 시스템제, 등록상표 『Bluescript II SK(+)』)를 통상적인 방법에 의해 제한 효소 Bam HI를 작용시켜 완전히 절단한 후, 그 절단된 플라스미드 벡터 0.5μg과 먼저 얻은 DNA 단편 약 5μg을 시판의 키트(일본국의 寶酒造제, 상품명 『DNA 라이게이션 키트』)를 사용하고, 첨부된 설명서에 따라 조작하여 연결하였다. 얻어진 재조합 DNA를 이용하여, 통상적인 컴피턴트 셀법에 의해 컴피턴트 셀(상품명 『Epicurian Coli XL2-Blue』, 스트라타진 클로닝 시스템제) 100μl를 형질 전환해서 유전자 라이브러리를 제작하였다.

[0192] 이렇게 하여 얻은 유전자 라이브러리로서의 형질 전환체를, 통상적인 방법에 의해 제조한, 10g/l 트립톤, 5g/l 효모 엑스, 5g/l 염화 나트륨, 100mg/l 암피실린 나트륨염, 50mg/l 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-β-갈락토시드를 함유하는 한천 평판 배지(pH 7.0)에 식균(植菌)하고, 37℃에서 24시간 배양 후, 배지 위에 형성된 백색 콜로니 약 4,000개를 나일론 막(상품명 『Hybond-N+』, 아머삼제) 위에 고정하였다. 별도로, 실험 5-7의 방법으로 밝혀진, 서열표에서의 서열번호 7로 나타내어지는 아미노산 서열에 있어서의 제4번째로부터 제13번째까지의 아미노산 서열에 근거해서 5'-GACGTSGTSCCSAACCACACSGCSGACTAC-3'로 나타내어지는 염기서열을 가진 올리고 뉴클레오타이드를 화학합성하고, 통상적인 방법을 따라 $[\gamma -^{32}P]$ ATP 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제를 이용해서 동위체 표지하여 프로브 1로서의 합성 DNA를 얻었다. 먼저 얻은 나일론 막 위에 고정한 콜로니 중에서, 프로브 1과 현저한 회합을 나타내는 콜로니를 통상적인 콜로니 하이브리다이제이션법을 적용해서 선택하여 5종류의 형질 전환체를 얻었다.

[0193] 이어서, 서열표에서의 서열번호 8로 나타내어지는 아미노산 서열에서의 제1번째로부터 제10번째까지의 아미노산 서열에 근거하여, 5'-GACTGGGTSGACATGGGSTTCGACGGSATC-3'로 나타내어지는 염기서열을 가진 올리고 뉴클레오타이드를 화학합성하고, 상기와 마찬가지로 동위체 표지해서 프로브 2로서의 합성 DNA를 얻었다. 통상적인 방법에 의해, 상기 5종류의 형질 전환체로부터 재조합 DNA를 채취하고, 통상적인 서어든 하이브리다이제이션을 적용하여, 프로브 2와 현저한 회합을 나타낸 재조합 DNA를 선택하고, 이 재조합 DNA를 가진 형질 전환체를 『BMB1』로 명명하였다.

[0194] 이 형질 전환체 BMB1을, 통상적인 방법을 따라 100μg/ml 암피실린 나트륨염을 함유하는 L-브로스 배지(pH 7.0)에 식균하고, 37℃에서 24시간 회전 진탕 배양하였다. 배양 종료 후, 원심분리에 의해 배양물로부터 균체를 채취하고, 통상적인 알칼리-SDS법에 의해 재조합 DNA를 추출하였다. 이 재조합 DNA의 염기서열을, 통상적인 디데옥시법에 의해 분석한 결과, 이 재조합 DNA는 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)에서 유래하는, 서열표에서의 서열번호 10으로 나타내어지는 체인(chain) 길이 4467 염기쌍의 염기서열을 가진 DNA를 함유하고 있었다. 도 9에 나타난 바와 같이, 이 재조합 DNA에 있어서, 이 DNA는 제한 효소 Bam HI에 의한 인식 부위의 하류에 연결되어 있었다. 한편, 이 염기서열로부터 추정되는 아미노산 서열은 그 서열번호 10에 병기한 바와 같고, 이 아미노산 서열과, 실험 5-6의 방법으로 확인된 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 N 말단 아미노산 서

열 및 실험 5-7의 방법으로 밝혀진 부분 아미노산 서열인, 서열표에서의 서열번호 1 및 서열번호 4 내지 9로 나타내어지는 아미노산 서열과 비교한 결과, 서열표에서의 서열번호 1로 나타내어지는 아미노산 서열은, 서열표에서의 서열번호 10에 병기한 아미노산 서열에 있어서의 제41번째 내지 제45번째의 아미노산 서열과 완전히 일치하였다. 또한, 서열표에서의 서열번호 4, 5, 6, 7, 8 및 9로 나타내어지는 아미노산 서열은, 각각 서열표에서의 서열번호 10으로 나타내어지는 염기서열에 병기한 아미노산 서열에서의 제418번째 내지 제426번째, 제405번째 내지 제417번째, 제323번째 내지 제332번째, 제164번째 내지 제190번째, 제241번째 내지 제265번째 및 제333번째 내지 제362번째의 아미노산 서열과 완전히 일치하였다. 이상은, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소가 서열표에서의 서열번호 2로 나타내어지는 아미노산 서열을 함유하는 것이고, 이 효소는 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)에서는, 서열표에서의 서열번호 3으로 나타난 염기서열의 DNA에 의해 코딩되어 있는 것을 나타내고 있다. 또한, 서열표에서의 서열번호 10에 병기한 아미노산 서열에 있어서의 제1번째 내지 제40번째의 아미노산 서열은 이 효소의 분비 시그널 서열로 추정되었다. 이들로부터, 이 효소의 분비 전의 전구체는, 서열표에서의 서열번호 10에 병기된 아미노산 서열로 이루어지고, 그 아미노산 서열은, 서열표에서의 서열번호 10에 나타내는 염기서열에 코딩되어 있는 것이 판명되었다. 이상과 같이 해서 제조하여 염기서열을 확인한 재조합 DNA를 『pBMB1』로 명명하였다.

[0195] <실험 7: 형질 전환체에 의한 환상 말토실 말토오스 생성효소의 산생>

[0196] 10g/l 전분 부분 분해물(상품명 『과인텍스 #4』, 일본국의 松谷화학공업 주식회사 판매), 20g/l 폴리펩톤, 20g/l 효모 엑스 및 1g/l 인산 1수소 나트륨?12수염 및 물로 된 액체 배지를, 500ml 용량의 삼각 플라스크에 100ml씩 넣고, 오토클레이브에서 121℃에서 20분간 멸균하여, 냉각하고, 무균적으로 pH 7.0으로 조정한 후, 암 피실린 나트륨염 10mg을 무균적으로 첨가해서 액체 배지를 제조하였다. 이 액체 배지에 실험 6-2의 방법으로 얻은 형질 전환체 BMB1을 접종하고, 27℃에서 약 48시간 회전 진탕 배양하였다. 얻어진 배양물을 통상적인 방법에 따라 원심분리해서 배양 상청과 균체로 분리해서 회수하였다. 균체에 대해서는 초음파 파쇄법에 의해 세포로부터의 전체 추출물을 제조하였다. 초음파 파쇄법은, 균체를 10mM 인산 완충액(pH 7.0)에 현탁한 후, 그 균체 현탁액을 얼음물 속에서 냉각하면서 초음파 호모지나이저(모델 UH-600, 주식회사 에스 엠 티제)에 의해 세포 파쇄함으로써 실시하고, 그 파쇄물을 전(全)세포 추출물로 하였다.

[0197] 이렇게 하여 제조한 배양 상청과 전세포 추출물에 대해서 각각의 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성을 측정하고, 각각의 활성값을 배양물 1ml 당(當)으로 환산하였다. 또한 대조로서 대장균 XL2-Blue주를 상기의 형질 전환체의 경우와 동일한 조건에서 배양하고, 배양물로부터 배양 상청과 전세포 추출물을 제조하여 마찬가지로 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성을 측정하였다. 이들 결과를 표 4에 나타낸다.

표 4

[0198]

균주	환상 말토실 말토오스 생성효소 활성 (단위/ml-배양물)	
	배양 상청	전세포 추출물
BMB1 (본 발명)	0.00	0.05
E. coli (대조)	0.00	0.00

[0199] 표 중의 BMB1 및 E. coli는 각각 형질 전환체 BMB1 및 대장균 XL2-Blue주를 의미한다.

[0200] 표 4의 결과로부터 명확한 바와 같이, 형질 전환체 BMB1은 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소를 세포 내에서 산생하는 것이 판명되었다. 숙주인 대조의 대장균에서는 배양 상청 및 전세포 추출물의 어디에서도 이 효소 활성은 전혀 나타나지 않았다.

[0201] 이 실험 7의 방법으로 얻은 전세포 추출물을, 다시 실험 4에 나타난 방법에 준하여 염석, 투석하고, DEAE-토요퍼일 650S 겔, 페닐-토요퍼일 650M 겔을 이용한 칼럼 크로마토그래피에 제공해서 정제하고, 또한 이 정제 효소 표품을 실험 5에 나타난 방법에 준해서 분석하였다. 그 결과, SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법에 의한 분자량은 약 72,000±20,000 달톤, 등전점 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동법에 의한 등전점은 약 3.6±0.5, 환상 말토실 말토오스 생성효소 활성의 최적 온도는 약 50 내지 55℃, 최적 pH는 약 5.5 내지 6.5, 온도 안정성은, 염화 칼슘 비존재 하에서 30℃까지, 1mM 염화 칼슘 존재 하에서 약 50℃까지 안정하고, pH 안정성은 약 5.0 내지 9.0의 범위에서 안정하였다. 이들 이화학적 성질은 실험 4에 나온 방법으로 제조된 이 효소의 그것과 실질적으로 동일하였다. 이상의 결과는, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는, 재조합 DNA 기술에 의해 양호하

게 제조할 수 있고, 더욱이 효소의 생산성도 유의하게 향상하는 것을 나타내고 있다.

[0202] <실험 8: 각종 당질에 대한 작용>

[0203] 각종 당질을 사용하여 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 기질 특이성을 조사하였다. 말토오스, 말토 트리오스, 말토테트라오스, 말토펜타오스, 말토헥사오스, 말토헤타오스, 네오패할로스, 트레할로스, 코지비 오스, 니게로오스, 이소말토오스, 이소말토타리오스, 파노오스, 이소파노오스, 말티톨, 말토타리이톨, α -, β - 또는 γ -사이클로덱스트린, 아밀로오스, 가용성 전분, 글리코젠, 풀룰란 또는 텍스트란을 함유하는 수용액을 제 조하였다. 이들 기질 용액에, 최종 농도 20mM 아세트산 완충액(pH 6.0)과 최종 농도 1mM 염화 칼슘을 첨가한 후, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 기질 고형물 1 그램당 각각 1 단위씩 첨가하여 기질 농도를 2w/v%가 되도록 조정하고, 이것을 40℃, pH 6.0에서 24시간 작용시켰다. 효소반응 전후 의 반응액을 실험 1 기재의 TLC법으로 분석하여, 각각의 당질에 대한 효소작용의 유무 또는 강도의 정도를 확인 하였다. 그 결과를 표 5에 나타낸다.

표 5

기 질	작용	기 질	작용
말토오스	-	파노오스	-
말토타리오스	+	이소파노오스	-
말토타트라오스	+++	말티톨	-
말토타펜타오스	+++	말토타리이톨	-
말토타헥사오스	+++	α -사이클로덱스트린	-
말토타헤타오스	+++	β -사이클로덱스트린	-
네오패할로스	-	γ -사이클로덱스트린	-
트레할로스	-	아밀로오스	+++
코지비오스	-	가용성 전분	+++
니게로오스	-	글리코젠	++
이소말토오스	-	풀룰란	-
이소말토타리오스	-	텍스트란	-

[0205] 주) 효소반응 전후에서,

[0206] -는 「변화없음」을 나타내고,

[0207] +는 「기질의 스폿이 약간 감소하고, 기타의 생성물이 나타남」을 나타내며,

[0208] ++는 「기질의 스폿이 상당히 감소하고, 기타의 생성물이 나타남」을 나타내고,

[0209] +++는 「기질의 스폿이 대부분 소실하고, 기타의 생성물이 나타남」을 나타낸다.

[0210] 표 5의 결과로부터 명확한 바와 같이, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는, 시험한 당질 중에서, 말토 테트라오스, 말토타펜타오스, 말토타헥사오스, 말토타헤타오스에 잘 작용하고, 또한 말토타리오스에 약간 작용하였다. 더욱이 아밀로오스, 전분, 글리코젠에도 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는 잘 작용하였다. 이들 결 과로부터, 이 효소는 글루코오스 중합도가 3 이상인 α -1,4 글루칸에 작용하는 것이 판명되었다.

[0211] <실험 9: 작용 메커니즘>

[0212] <실험 9-1: 말토타테트라오스로부터의 생성물>

[0213] 최종 농도 1w/v%의 말토타테트라오스 수용액에, 최종 농도 20mM 아세트산 완충액(pH 6.0)과 최종 농도 1mM 염화 칼슘을 가한 후, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소를, 기질 고형물 1 그램당 1 단위 첨가하고, 40℃, pH 6.0에서 작용시켜 경시적으로 샘플링을 하고, 100℃에서 10분간 유지해서 반응을 정지하였 다. 이 효소 반응액의 당 조성을 HPLC법을 이용해서 측정하였다. HPLC는, 칼럼으로서 『YMC Pack ODS-AQ303』 (주식회사 와이?엠?시 제조)을 사용하고, 용리액으로서 물을 사용하며, 칼럼 온도 40℃, 유속 0.5ml/분의 조건 으로 실시하고, 검출은 시차(示差) 굴절계 RID-10A(주식회사 島津제작소 제조)를 사용하여 실행하였다. 그 결과 를 표 6에 나타낸다.

표 6

반응시간 (시간)	당 조성 (%)						
	말토오스	환상 말토실 말토시드	말토테트라오스	말토실 말토오스	말토헥사오스	당질 X	기타
0	0.0	0.0	97.3	0.0	0.0	0.0	2.7
1	9.0	2.6	69.5	0.5	3.9	11.3	1.8
2	15.6	6.6	51.7	0.9	5.6	14.0	2.6
4	22.8	12.5	35.5	1.8	5.4	14.7	3.5
8	31.7	21.3	19.1	3.8	4.1	10.8	5.7
16	36.3	25.6	10.9	6.9	2.5	8.2	6.5
24	38.7	28.6	6.9	9.6	1.2	7.1	6.1

표 중에서, 말토실 말토오스는 6^2 -O- α -말토실 말토오스를 의미하고,

당질 X는 아래에서 설명하는 실험 9-3에 의하여 α -말토실 말토테트라오스(별명: 6^4 -O- α -말토실 말토테트라오스)인 것이 판명되었음.

표 6의 결과로부터 명확한 바와 같이, 이 효소의 작용의 결과, 기질 말토테트라오스로부터, 반응 초기(반응 1시간)에 있어서, 말토오스와 당질 X가 현저하게 생성하는 것이 판명되었다. 또한 소량이지만, 말토헥사오스, 환상 말토실 말토오스 및 말토실 말토오스(6^2 - α -말토실 말토오스, 비환상)가 생성하는 것도 알 수 있다. 그리고 반응의 진행과 함께, 이들 생성 당질 중에서, 말토오스와 환상 말토실 말토오스가 현저한 양으로 축적하고, 소량이지만 말토실 말토오스의 양도 증가하였다. 한편, 당질 X 및 말토헥사오스의 생성량은 반응 4시간까지 증가했지만, 그 이후는 감소하는 것이 판명되었다. 이들 결과로부터 추측하면, 반응 초기에 있어서, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소는 말토테트라오스에 작용하여 주로 말토오스와 당질 X를 생성하고, 더욱 반응이 진행됨에 따라 이 효소는 당질 X에 작용하여 환상 말토실 말토오스를 생성한다고 추정되며, 당질 X가 말토테트라오스로부터의 환상 말토실 말토오스 생성반응의 중간체라고 생각되었다. 또한 말토실 말토오스나 말토헥사오스가 동시에 생성하는 것으로부터 이 효소는 말토오스 단위에서의 당전이를 촉매하는 효소이며, 당질 X도 말토실 전이에 의한 생성물이라고 추정되었다.

<실험 9-2: 당질 X의 단리>

말토테트라오스로부터 환상 말토실 말토오스를 생성하는 반응에서의 반응 중간체로 생각되는 당질 X를 단리하였다. 최종 농도 1w/v%의 말토테트라오스 수용액 2L에, 최종 농도 20mM 아세트산 완충액(pH 6.0)과 최종 농도 1mM 염화 칼슘을 가한 후, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소를, 기질 고형물 1 그램당 1 단위 첨가하고, 40℃, pH 6.0에서 4시간 작용시킨 후, 100℃에서 10분간 유지해서 반응을 정지시켰다. 이어서, 예비 시험에 의해 당질 X가 β -아밀라아제에 의해 분해되지 않는 것을 확인한 후, 상기에서 얻어진 반응액을 pH 5.5로 조정하고, β -아밀라아제(시그마사제)를 기질 고형물 1 그램당 5 단위 첨가해서 50℃에서 16시간 처리함으로써, 반응액 중의 잔존하는 말토테트라오스를 말토오스로 분해하였다. 이 반응액을 100℃에서 10분간 유지해서 반응을 정지시키고, 불용물을 여과해서 제거한 후, 일본국의 미쓰비시 화학제 이온교환 수지 『다이아이온 WA30』을 사용해서 탈색, 탈염하고, 또한 일본국의 미쓰비시 화학제 캐타이온 교환 수지 『다이아이온 SK-1B』와 오르가노제 음이온 교환 수지 『IRA411S』를 사용해서 탈색, 탈염하고, 정밀 여과한 후, 에바포레이터에서 농축하여 분획 원료로 하였다. 이것을, 분취용 HPLC 칼럼 『YMC-Pack ODS-A R355-15S-15 12A』(주식회사 와이?엠프?시제)에 제공하여 정제하고, 상기의 말토테트라오스로부터의 반응물로부터 순도 99.3% 이상의 당질 X 표품을 고형물 수율 약 6.7%로 얻었다.

<실험 9-3: 당질 X의 구조분석>

<실험 9-3-1: 환상 말토실 말토오스의 생성시험>

실험 9-2의 방법으로 얻은 당질 X 정제 표품의 수용액(최종 농도 1w/v%)에, 최종 농도 20mM 아세트산 완충액(pH 6.0)과 최종 농도 1mM 염화 칼슘을 첨가한 후, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소를 기질 고형물 1 그램당 1 단위 첨가하고, 40℃, pH 6.0에서 24시간 작용시켜, 100℃에서 10분간 유지해서 반응을 정지한 후, 실험 1 기재의 TLC법 및 HPLC법으로 분석하여 생성물을 조사한 결과, 주로 말토오스와 환상 말토실 말토오스가 생성하는 것이 판명되어, 당질 X가 환상 말토실 말토오스 생성반응의 중간체인 것이 확인되

었다.

[0223] <실험 9-3-2: 질량분석>

[0224] 실험 9-2의 방법으로 얻은 당질 X 정제 표품에 대해서, 실험 2-1에 기재한 방법으로 질량 분석을 한 결과, 질량수 1013의 나트륨 부가 분자 이온이 현저하게 검출되어, 당질 X의 질량수가 990인 것이 밝혀지고, 이 질량수로부터, 당질 X는 D-글루코오스 6 분자로 구성되어 있는 것을 알았다.

[0225] <실험 9-3-3: 풀룰라나아제에 의한 분해 시험>

[0226] 실험 9-2의 방법으로 얻은 당질 X 정제 표품의 수용액(최종 농도 1w/v%)에 풀룰라나아제(일본국의 주식회사 林原 생물화학 연구소 제조)를 작용시켜 분해 시험을 하였다. 기질 고형물 1 그램당 풀룰라나아제를 1 단위 가 하고, 40℃, pH 6.0에서 24시간 작용시켜, 100℃에서 10분간 유지해서 반응을 정지한 후, 실험 1 기재의 TLC법 및 HPLC법으로 분석하여 생성물을 조사한 결과, 말토오스와 말토테트라오스가 생성하는 것이 판명되었다. 즉, 당질 X는 말토오스 분자와 말토테트라오스 분자가 α-1,6 글루코시드 결합한 구조를 가진 것이 판명되었다.

[0227] <실험 9-3-4: 메틸화 분석>

[0228] 실험 9-2의 방법으로 얻은 당질 X 표품을 사용하고, 통상적인 방법을 따라 메틸화 분석을 하여, 가스 크로마토 그래피법으로 메틸화물을 조사하였다. 그 결과를 표 7에 정리하였다.

표 7

[0229]

분석 메틸화물의 종류	비율
2,3,4-트리메틸화물	1.00
2,3,6-트리메틸화물	4.04
2,3,4,6-테트라 메틸화물	0.85

[0230] 표 7의 결과로부터 명확한 바와 같이, 2,3,4-트리메틸화물과 2,3,6-트리메틸화물 및 2,3,4,6-테트라 메틸화물이 약 1:4:1의 비율이기 때문에, 당질 X를 구성하는 글루코오스 6 분자 중에서, 1 분자는 1위치와 6위치에서 글루코시드 결합하고 있는 글루코오스이고, 4 분자는 1위치와 4위치에서 글루코시드 결합하고 있는 글루코오스이며, 다른 1 분자는 1위치만이 글루코실 결합한 글루코오스인 것이 판명되었다. 또한 이 결과로부터, 말토오스와 말토테트라오스가 α-1,6 결합한 당질 X에서의 1,6 글루코시드 결합은 비환원 말단 글루코오스 잔기에 존재하는 것이 판명되었다.

[0231] 이상의 결과로부터, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소에 의해 말토테트라오스로부터 생성하는 당질 X는, 환상 말토실 말토오스 생성반응의 중간체이고, 그 구조는 말토테트라오스의 비환원 말단 글루코오스 잔기의 6위치 히드록실기에 말토오스기가 α 결합한 6당으로서, 구조식 1로 나타내어지는 α-말토실 말토테트라오스(6⁴-α-말토실 말토테트라오스)인 것이 판명되었다.

[0232] 구조식 1:

[0233] α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→6)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Glcp-(1→4)-D-Glcp

[0234] 이상으로부터, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소에 의한 환상 말토실 말토오스 생성의 반응 메커니즘은 아래와 같이 생각되었다.

[0235] 1) 이 효소는, 기질로서 글루코오스 중합도가 3 이상인 α-1,4 글루칸에 작용하여, 그 비환원성 말단의 말토실 잔기를 다른 α-1,4 글루칸 분자의 비환원성 말단 글루코오스 잔기의 6위치 히드록실기로 전이하는 분자 간의 6-α-말토실 전이를 촉매함으로써, 비환원 말단에 6-α-말토실기를 가진 글루코오스 중합도가 2 증가한 6-α-말토실말토올리고당과, 글루코오스 중합도가 2 감소한 말토올리고당을 생성한다.

[0236] 2) 이 효소는 또한 6-α-말토실말토올리고당에 작용하여 분자 내 α-말토실 전이함으로써 환상화하여, 사이클로 {→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→}의 구조를 가진 환상 말토실 말토오스와, 글루코오스 중합도가 4 감소한 말토올리고당을 생성한다.

[0237] 3) 이 효소는, 약간이지만 분자 간의 4- α -말토실 전이도 촉매하여, 말토올리고당으로부터, 글루코오스 중합도가 2 증가한 말토올리고당과 글루코오스 중합도가 2 감소한 말토올리고당을 약간 생성한다.

[0238] <실험 10: 각종 기질로부터의 환상 말토실 말토오스의 생성>

[0239] 각종 당질을 사용하여, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소의 작용에 의한 환상 말토실 말토오스의 생성을 시험하였다. 말토트리오스, 말토테트라오스, 말토펜타오스, 말토헥사오스, 아밀로오스, 가용성 전분, 전분 부분 분해물(상품명 『파인텍스 #100』, 일본의 松谷화학공업 주식회사제), 글리코겐(옥수수 유래, 큐피 주식회사제)의 용액을 제조하였다.

[0240] 이들 수용액(최종 농도 1.0w/v%)에, 최종 농도 20mM 아세트산 완충액(pH 6.0)과 최종 농도 1mM 염화 칼슘을 첨가한 후, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 고형물 1 그램당 1 단위 첨가하고, 이들을 40℃, pH 6.0에서 48시간 작용시킨 후, 그 반응액을 100℃에서 10분간 가열해서 반응을 정지시켰다. 실험 1과 마찬가지로 α -글루코시다아제·글루코아밀라아제 처리한 후, HPLC법으로 환상 말토실 말토오스를 정량하여 환상 말토실 말토오스의 생성물을 구하였다. 그 결과를 표 8에 나타낸다.

표 8

기 질	환상 말토실 말토오스 생성률(%)
말토트리오스	0.6
말토테트라오스	27.3
말토펜타오스	24.4
말토헥사오스	41.6
말토펜타오스	36.6
아밀로오스	41.8
가용성 전분	31.4
전분 부분 분해물	32.6
글리코겐	29.5

[0242] 표 8의 결과로부터 명확한 바와 같이, 시험한 어떤 당질로부터도, 환상 말토실 말토오스 생성효소의 작용에 의해 환상 말토실 말토오스가 생성하였다. 그 생성물은, 기질이 말토트리오스인 경우 약 0.6%로서 낮은 것에 대해서, 기질이 아밀로오스인 경우 약 42%로서 가장 높고, 이어서 말토헥사오스, 말토펜타오스의 순서였다. 가용성 전분, 전분 부분 분해물 및 글리코겐으로부터도 30% 정도의 생성물로서 환상 말토실 말토오스가 생성하였다.

[0243] <실험 11: 환상 말토실 말토오스 생성반응과 반응 산물의 환원력>

[0244] 가용성 전분의 수용액(최종 농도 1.0w/v%)에, 최종 농도 20mM 아세트산 완충액(pH 6.0)과 최종 농도 1mM 염화 칼슘을 첨가한 후, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 고형물 1 그램당 1 단위 첨가하고, 이들을 40℃, pH 6.0에서 반응시켜, 효소첨가 직후에 샘플링하고, 즉시 약 100℃에서 10분간 가열해서 반응을 정지하여 물로 냉각하고, 반응 0시간의 반응액을 얻었다. 계속해서, 반응 1, 2, 3, 4시간, 각각의 시점에서 샘플링하고, 즉시 약 100℃에서 10분간 가열해서 반응을 정지하여, 물로 냉각하고, 반응 1시간, 반응 2시간, 반응 3시간, 반응 4시간의 각각의 반응액을 얻었다. 얻어진 반응액의 환원당(還元糖)의 양을 소모기?넬슨법에 의하여, 전체 당(糖)의 양을 안트론법으로 측정하고, 전체 당의 양에서 차지하는 환원당의 양의 비율을 백분률(%)로 나타내어 환원력으로 하였다. 또한 반응액을 실험 1과 마찬가지로 α -글루코시다아제?글루코아밀라아제 처리한 후, HPLC법으로 환상 말토실 말토오스를 정량하여 환상 말토실 말토오스의 생성물을 구하였다. 이들 결과를 표 9에 정리하였다.

표 9

반응 시간(시간)	환원력 (%)	환상 말토실 말토오스 생성률 (%)
0	0.3	0
1	0.3	4.7
2	0.4	8.4

3	0.5	11.2
4	0.5	13.7

[0246] 표9의 결과로부터 명확한 바와 같이, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소를 가용성 전분에 작용시켜 환상 말토실 말토오스를 생성시킨 결과, 환상 말토실 말토오스의 생성률이 10% 이상인 경우라도 환원력의 증가는 0.2% 정도로서 극히 약간인 것이 판명되었다. 이것은, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소가 본질적으로 전이?환상화 반응을 촉매하는 효소이고, 이들 반응 시에는 거의 가수 분해를 수반하지 않는 것을 뜻하고 있다. 전분이나 그 분해물 등에 이 효소를 작용시켜 환상 말토실 말토오스를 생성시킬 때, 반응 전의 전분이나 그 분해물의 환원력, 즉 DE를 낮게 해 두면, 증가하는 환원력이 얼마 되지 않기 때문에, 환원력이 낮은 생성물이 얻어지는 것을 알 수 있었다.

[0247] <실험 12: 환상 말토실 말토오스의 생성에 미치는 이소아밀라아제의 첨가 효과>

[0248] 전분 부분 분해물(상품명 『파인텍스 #100』, 일본의 松谷화학공업 주식회사제) 수용액(최종 농도 1w/v%)을 제조하고, 최종 농도 20mM 아세트산 완충액(pH 6.0)과 최종 농도 1mM 염화 칼슘을 첨가한 후, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 고형물 1 그램당 1 단위와, 이소아밀라아제(일본국의 주식회사 林原 생물화학 연구소 제조)를 고형물 1 그램당 각각 0, 125, 250, 500, 1250 또는 2500 단위 가하고, 40℃, pH 6.0에서 48시간 작용시킨 후, 100℃에서 10분간 열처리해서 효소를 실효시켰다. 계속해서, 반응액을 실험 1과 마찬가지로 α-글루코시다아제 및 글루코아밀라아제로 처리한 후, HPLC법으로 환상 말토실 말토오스를 정량하여 환상 말토실 말토오스 생성률을 구하였다. 그 결과를 표 10에 나타낸다.

표 10

[0249]

이소아밀라아제 첨가량 (단위)	환상 말토실 말토오스 생성률 (%)
0	32.2
125	40.1
250	40.1
500	40.9
1250	41.0
2500	41.7

[0250] 표 10의 결과로부터 명확한 바와 같이, 이소아밀라아제를 첨가함으로써 환상 말토실 말토오스의 생성률이 증가하는 것이 판명되었다.

[0251] <실험 12: 환상 말토실 말토오스의 생성에 미치는 액화 전분 DE의 영향>

[0252] 옥수수 전분을 농도 2 질량% 전분유(澱粉乳)로 하고, 여기에 탄산 칼슘을 0.1 질량% 첨가해서 pH 6.0으로 조정하고, α-아밀라아제(상품명 『타마밀 60L』, 노보사 제조)를 전분 그램당 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 1.5 또는 2.0 질량% 가해서, 각각 95℃에서 10분간 반응시키고, 이어서 120℃에서 오토클레이브하여 약 40℃로 급랭함으로써 DE 3.1 내지 20.4의 표 11에 나타내는 6종류의 전분 액화액을 얻었다. 이들 전분 액화액(최종 농도 1 질량%)에, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 고형물 1 그램당 1 단위 첨가하고, 40℃, pH 6.0에서 48시간 작용시킨 후, 그 반응액을 10분간 펄펄 끓여서 반응을 정지시켰다. 이들 열실활(熱失活)시킨 반응액 중의 환상 말토실 말토오스의 생성량을 조사하기 위해서, 실험 1과 마찬가지로 α-글루코시다아제 및 글루코아밀라아제를 첨가해서 반응시킨 후, HPLC법으로 환상 말토실 말토오스를 정량하여 환상 말토실 말토오스 생성률을 구하였다. 그 결과를 표 11에 나타낸다.

표 11

[0253]

α-아밀라아제 사용량 (질량%/g-전분)	DE	환상 말토실 말토오스 생성률 (%)
0.2	3.1	32.6

0.4	4.8	30.3
0.6	7.9	26.2
1.0	12.6	23.1
1.5	17.4	21.2
2.0	20.4	20.9

[0254] 표 11의 결과로부터 명확한 바와 같이, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소에 의한 환상 말토실 말토오스의 생성물은 액화 전분의 DE에 의해 영향을 받고, DE가 낮은 값일수록, 환상 말토실 말토오스의 생성물은 높고, 반대로, DE가 높은 값일수록, 환상 말토실 말토오스의 생성물이 낮은 것이 판명되었다. 구체적으로는, 액화 전분의 DE는 약 20 이하, 바람직하게는 DE 약 8 이하, 더욱 바람직하게는 DE 약 5 이하가 적합하다는 것이 판명되었다.

[0255] <실험 14: 결정 환상 말토실 말토오스의 제조>

[0256] 아밀로오스(주식회사 林原 생물화학 연구소 제조), 아세트산 완충액(pH 6.0), 및 염화 칼슘을, 최종 농도로서 각각 1.25w/v%, 20mM, 1mM 함유하는 수용액 16L에, 실험 4의 방법으로 얻은 정제 환상 말토실 말토오스 생성효소 표품을 고형물 1 그램당 1 단위 가하고, 이것을 40℃, pH 6.0에서 90시간 작용시킨 후, 반응액을 약 98℃에서 10분간 가열해서 반응을 정지시켰다. 얻어진 반응액을, 실험 1에 기재한 방법으로 글루코아밀라아제 처리하고, 수산화 나트륨에 의해 알칼리 처리함으로써 환원당을 분해한 후, 여과 탈색, 탈염, 정밀 여과, 농축, 진공 건조하여 고형물로서 약 80.5g의 환상 말토실 말토오스 분말을 얻었다. HPLC법으로 분석한 결과, 환상 말토실 말토오스의 순도는 98.9%이었다.

[0257] 얻어진 환상 말토실 말토오스 분말(고형물로서 36g)을 144g의 물에 가하고, 약 90℃로 가온해서 환상 말토실 말토오스를 완전히 용해시킨 후, 약 25℃에서 2일간 정치(靜置)한 결과, 결정상의 물질을 생성하였다. 얻어진 결정상 물질을 함유하는 액을 여과하여 여과지 위에 결정상 물질을 회수하고, 계속해서 소량의 물로 세정한 후, 결정상 물질을 수집하여 상온, 상압에서 풍건(風乾)하여 21.8g의 결정상 분말을 얻었다. HPLC법으로 분석한 결과, 환상 말토실 말토오스의 순도는 99.9% 이상으로서 극히 고순도이었다.

[0258] 얻어진 환상 말토실 말토오스의 결정상 분말에 대해서, X선 회절 장치 RAD-II X(일본국의 주식회사 리가쿠제)을 사용해서 분말 X선 회절 측정을 한 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 주(主) 회절각(2 θ)으로서, 5.6°, 9.3°, 16.5° 및 27.1°를 특징으로 하는 분말 X선 회절도가 얻어졌다. 또한 이 결정상 분말의 수분을 카알 피셔법으로 측정한 결과, 수분은 12.8 질량%이어서, 환상 말토실 말토오스 1 분자당 5 분자의 물을 함유하는 함수 결정인 것이 판명되었다.

[0259] 더욱이 이 환상 말토실 말토오스의 결정 분말을 열중량 측정한 결과, 도 11에 나타내는 열중량 곡선이 얻어지는데, 그 중량변화와 온도의 관계로부터, 온도 약 100℃까지의 상승에서 5 분자의 물에 상당하는 중량 감소가 나타나고, 또한 온도 약 280℃ 부근에서 환상 말토실 말토오스 자체의 열분해로 생각되는 중량 감소가 나타났다. 이들 사실로부터, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 함수 결정은, 상압에서 온도를 100℃까지 상승시킴으로써 결정 분자당 5 분자의 물이 이탈해서 무수물이 되는 것이 판명되었다.

[0260] <실험 15: 환상 말토실 말토오스의 물에 대한 포화 농도>

[0261] 온도 25℃에서의 물에 대한 환상 말토실 말토오스의 포화 농도를 조사하기 위해서, 밀봉용 마개를 가진 유리제 용기에 물 10ml를 넣고, 거기에 실험 14의 방법으로 얻어지는 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말이 완전히 용해되는 양 이상의 양을 가한 후, 유리 용기를 밀봉하고, 포화에 도달할 때까지 온도 25℃에서 보온하면서 2일간 교반하였다. 이 환상 말토실 말토오스 포화 용액을 정밀 여과하여, 용해되지 않은 환상 말토실 말토오스를 제거한 후, 그 여과액의 수분을 건조 감량법으로 조사해서 포화 농도를 구한 결과, 온도 25℃에서의 물에 대한 환상 말토실 말토오스의 포화 농도는 약 8.0 질량%인 것이 판명되었다.

[0262] <실험 16: 환상 말토실 말토오스의 감미도>

[0263] 실험 14의 방법으로 얻어지는 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말을 탈이온수에 용해하여 고형물 농도 5 질량%의 수용액으로 하고, 이 수용액을 감미도 시험 용액으로 하였다. 한편, 수크로오스(시판 그레놀레이트 당) 0.5 내지 5 질량% 수용액을 제조하여 대조로 하였다. 패널리스트 5명에 의해 관능시험을 한 결과, 환상 말토실 말토오스의 감미도는 수크로오스의 약 20%인 것으로 추정되어, 환상 말토실 말토오스가 낮은 감미의 당질인 것

이 판명되었다.

[0264] <실험 17: 환상 말토실 말토오스의 열 안정성>

[0265] 실험 14의 방법으로 얻어지는 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말을 물에 용해하여 농도 7w/v%의 환상 말토실 말토오스 수용액을 제조하고, 그 용액 8ml를 유리제 시험관에 넣고 밀봉한 후, 120℃에서 30 내지 90분간 가열하였다. 방냉 후, 이들 용액의 착색도의 측정과 HPLC법에 의한 환상 말토실 말토오스의 순도 측정을 하였다. 착색도는 480nm에 있어서의 1cm 셀에서의 흡광도로 하였다. 그 결과를 표 12에 나타냈다.

표 12

가열 시간(분)	착색도 (A480nm)	순도 (%)
0	0	100
30	0	100
60	0	100
90	0	100

[0267] 표 12의 결과로부터 명확한 바와 같이, 환상 말토실 말토오스 수용액은 120℃의 고온 가열에서도 착색은 없고, 분해에 의한 순도 저하도 나타나지 않아서, 환상 말토실 말토오스는 열에 대하여 안정한 당질인 것이 판명되었다.

[0268] <실험 18: 환상 말토실 말토오스의 pH 안정성>

[0269] 실험 14의 방법으로 얻어지는 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말을 각종 완충액(20mM)에 용해하여 환상 말토실 말토오스를 농도 4w/v%, pH를 2 내지 9로 조정한 표 13에 기재한 8종류의 환상 말토실 말토오스 수용액을 제조하였다. 각각의 용액 8ml를 유리제 시험관에 넣고 밀봉한 후, 100℃에서 24시간 가열하였다. 방냉 후, 실험 17과 마찬가지로 이들 용액의 착색도의 측정과 HPLC법에 의한 환상 말토실 말토오스의 순도 측정을 하였다. 그 결과를 표 13에 나타냈다.

표 13

pH	완충액의 종류	착색도 (A480nm)	순도 (%)
2.0	아세트산	0	93
3.0	아세트산	0	100
4.0	아세트산	0	100
5.0	아세트산	0	100
6.0	Tris-염산	0	100
7.0	Tris-염산	0	100
8.0	Tris-염산	0	100
9.0	암모늄	0	100

[0271] 표 13의 결과로부터 명확한 바와 같이, 환상 말토실 말토오스 수용액은 100℃의 고온에서 24시간 가열해도, pH 2 내지 9의 넓은 범위에서 착색은 없고, pH 2에서 환상 말토실 말토오스는 약간 분해되어 순도 저하가 나타났지만, pH 3 내지 9의 범위에서는 전혀 분해되지 않고, 환상 말토실 말토오스는 넓은 pH 범위에서 펄펄 끓여도 극히 안정한 당질인 것이 판명되었다.

[0272] <실험 19: 아미노카르보닐 반응>

[0273] 실험 14의 방법으로 얻어지는 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말을 물에 용해하고, 또한 시판 시약 특급의 글라이신 및 인산 완충액을 가하고, 50mM 인산 완충액으로 pH 8.0으로 조정한 0.5w/v% 글라이신을 함유하는 2.5w/v% 환상 말토실 말토오스 수용액을 제조하였다. 대조로서, 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말 대신에 말토오스를 사용한 이외는 상기와 마찬가지로 해서 말토오스 수용액을 제조하였다. 각각의 용액 4ml를 유리제 시험관에 넣고 밀봉한 후, 100℃에서 30 내지 90분간 가열하였다. 실내에서 방냉 후, 이들의 착색도를 측정해서 아미노카르보닐 반응성을 조사하였다. 착색도는 1cm 셀에서의 480nm에 있어서의 흡광도로 하였다. 그 결과를 표

14에 나타낸다.

표 14

[0274]

가열 시간(분)	착색도 (A480nm)	
	환상 말토실 말토오스	말토오스 (대조)
0	0.00	0.00
30	0.00	0.02
60	0.00	0.08
90	0.00	0.17

[0275]

표 14의 결과로부터 명확한 바와 같이, 대조의 말토오스는 글리신 공존 하에서 가열하면 착색하여 갈변을 발생시켰다. 한편, 본 발명의 환상 말토실 말토오스는 글라이신 공존 하에서 가열해도 착색하지 않아 갈변을 발생시키지 않으므로, 아미노카르보닐 반응(메일라아드 반응)을 일으키기 어려운 안정한 당질인 것이 판명되었다.

[0276]

<실험 20: 아미노카르보닐 반응>

[0277]

실험 14의 방법으로 얻어지는 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말과 시판 폴리펩톤(일본제약제)을 탈이온수에 용해하여 5w/v% 폴리펩톤을 함유하는 5w/v% 환상 말토실 말토오스 용액을 제조하였다. 대조로서, 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말 대신에 말토오스를 사용한 이외는 상기와 마찬가지로 해서 말토오스 수용액을 제조하였다. 각각의 용액 4ml를 유리제 시험관에 넣고 밀봉한 후, 120℃에서 30 내지 90분간 가열하였다. 실내에서 방냉 후, 이들의 착색도를 측정하여 아미노카르보닐 반응성을 조사하였다. 동시에, 폴리펩톤만을 함유하는 용액을 블랭크로 하여 마찬가지로 가열하였다. 착색도는, 480nm에 있어서의 1cm 셀에서의 흡광도로 하고, 블랭크의 흡광도를 뺀 값으로 하였다. 그 결과를 표 15에 나타낸다.

표 15

[0278]

가열 시간(분)	착색도 (A480nm)	
	환상 말토실 말토오스	말토오스 (대조)
0	0.00	0.00
30	0.00	0.10
60	0.00	0.30
90	0.00	0.62

[0279]

표 15의 결과로부터 명확한 바와 같이, 대조인 말토오스는 폴리펩톤 공존 하에서 가열하면 착색하여 갈변을 발생시켰다. 한편, 환상 말토실 말토오스는 폴리펩톤 공존 하에서 가열해도 착색하지 않아 갈변을 발생시키지 않으므로, 아미노카르보닐 반응을 일으키기 어려운 안정한 당질인 것이 판명되었다.

[0280]

<실험 21: 환상 말토실 말토오스의 포접(包接) 작용>

[0281]

실험 14의 방법으로 얻어지는 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말을 탈이온수에 용해하여 8 질량% 수용액을 제조하였다. 그 수용액 100g당(當), 향기성분의 구체적인 예로서, 메탄올 1.2g, 에탄올 1.7g 또는 아세트산 2.2g을 각각 가하여 포접(包接)을 하였다. 그 후, 각각을 여과해서 여액을 동결 건조하고, 미포접물(未包接物)을 제거하였다. 대조로서, 포접(包接) 능력을 가진 것이 알려져 있는 분기 사이클로텍스트린(상품명 이소엘리트 P, 마루하 주식회사 판매)을 사용하여 마찬가지로의 조작을 하였다. 동결 건조 분말 중의 포접물(包接物)의 양을 측정하기 위해서, 각각의 동결 건조 분말 1g을 5ml의 물에 용해하고, 거기에 5ml의 디에틸 에테르를 가해서 추출을 하고, 다시 추출을 반복한 후, 디에틸 에테르 중의 추출물을 가스 크로마토그래피법으로 정량하였다. 그 결과를 표 16에 나타낸다.

표 16

[0282]

포접물	포접량 (mg/g-동결 건조 분말)	
	환상 말토실 말토오스	분기 사이클로텍스트린

메탄올	4.30	3.23
에탄올	4.20	8.67
아세트산	30.55	38.14

[0283] 표 16의 결과로부터 명확한 바와 같이, 환상 말토실 말토오스는 포접 능력을 가지고 있는 것이 밝혀지고, 그 포접 능력은 분기 사이클로텍스트린의 것과 비교하여 메탄올에서는 중량당 약 1.3배, 에탄올에서는 약 0.5배, 아세트산에서는 약 0.8배의 강도이었다.

[0284] <실험 22: 환상 말토실 말토오스의 소화성 시험>

[0285] 실험 14의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말을 사용하고, 일본 영양식량 학회지, 제43권, 제23 페이지 내지 제29 페이지(1990)에 기재된 오카다(岡田) 등의 방법에 준하여, 시험관 내에서의 타액 아밀라아제, 인공 위액, 췌액 아밀라아제, 소장 점막 효소에 의한 환상 말토실 말토오스의 소화성을 조사하였다. 대조로서, 난(難)소화성 당질로서 알려져 있는 말티톨을 사용하였다. 그 결과를 표 17에 나타낸다.

표 17

소화 효소	분해율 (%)	
	환상 말토실 말토오스	말티톨(대조)
타액 아밀라아제	0	0
인공 위액	0	0
췌액 아밀라아제	0	0
소장 점막 효소	0	4

[0287] 표 17의 결과로부터 명확한 바와 같이, 환상 말토실 말토오스는, 타액 아밀라아제, 인공 위액, 췌액 아밀라아제 및 소장 점막 효소의 어느 것에 의해도 전혀 소화되지 않는 것을 알 수 있어, 극히 소화되기 어려운 당질인 것이 판명되었다.

[0288] <실험 23: 환상 말토실 말토오스의 발효성 시험>

[0289] 실험 14의 방법으로 얻어지는 환상 말토실 말토오스 함수 결정 분말을 사용하고, 문헌[Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 제37권, 529 내지 544 페이지(1991년)]에 기재된 奥 등의 방법에 준하여, 래트 맹장 내용물에 의한 환상 말토실 말토오스의 발효성을 조사하였다. 맹장 내용물은, 위스타게 수컷 래트를 에테르 마취 하에서 도살해서 혐기적으로 채취하여, 4배량의 0.1M 탄산 수소 나트륨 수용액에 현탁한 것을 사용하였다. 환상 말토실 말토오스는 맹장 내용물 중량당 약 7 질량%를 첨가하고, 첨가 직후 및 12시간 후에 잔존하는 환상 말토실 말토오스의 양을 가스 크로마토그래피법으로 정량하였다. 그 결과, 첨가 직후의 환상 말토실 말토오스 농도는 맹장 내용물 1 그램당 68.5mg, 12시간 후의 환상 말토실 말토오스 농도는 맹장 내용물 1 그램당 63.0mg 이어서, 약 92%가 발효되지 않고 잔존하고 있는 것을 알 수 있어, 환상 말토실 말토오스는 극히 발효되기 어려운 당질인 것이 판명되었다.

[0290] <실험 24: 급성 독성 시험>

[0291] 마우스를 사용하고, 실험 14의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스를 경구투여해서 급성 독성 시험을 하였다. 그 결과, 환상 말토실 말토오스는 저(低)독성의 물질이고, 투여가능한 최대 투여량에서도 사망에는 나타나지 않으며, 그 LD₅₀ 값은 5g/kg-마우스 체중 이상이었다.

[0292] 이상의 실험 22 내지 24의 결과로부터, 환상 말토실 말토오스는 경구섭취하더라도 소화, 흡수되기 어렵고, 무(無)칼로리 내지 저칼로리의 가식(可食) 소재로 하여 다이어트 감미료, 고감미도 감미료의 부형제, 다이어트 음식물의 증점제, 증량제, 부형제, 더욱이는 식물(食物) 섬유, 지방 대체 식품 재료 등으로서 유리하게 이용할 수 있다.

[0293] 이하, 본 발명의 환상 말토실 말토오스 및 그것을 함유하는 당질의 제조 방법을 실시예 1 내지 6에서, 환상 말토실 말토오스 및 그것을 함유하는 당질을 함유시킨 조성물을 실시예 7 내지 23에서 설명한다.

[0294] 실시예 1

[0295] 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448)을 실험 3의 방법에 준하여 종배양(種培養)하였다. 이어서 용량 30L의 퍼멘터에, 전분 부분 분해물(상품명 『파인텍스 #100』, 일본국의 松谷화학공업 주식회사 제조) 3.0w/v%, 대두 캅티드(상품명 『하이뉴토 SMS』, 일본국의 不二製油 주식회사 제조) 3.6w/v%, 인산 2칼륨 0.1w/v%, 인산 1나트륨 2수염 0.06w/v%, 황산 마그네슘 7수염 0.05w/v%, 탄산 칼슘 0.3w/v%, 및 물로 된 액체 배지를 약 20L 넣고, 가열 멸균, 냉각해서 온도 27℃로 한 후, 종배양액 1v/v%를 접종하고, 온도 27℃, pH 5.5 내지 8.0으로 유지하면서 96시간 통기 배양하였다. 배양 후, SF막을 사용해서 체균 여과하여 약 18L의 배양 여액을 회수하고, 더욱이 그 여액을 UF막 농축하여 3.8 단위/ml의 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소를 함유하는 농축 효소액 약 1L를 회수하였다.

[0296] 실시예 2

[0297] 감자 전분유(澱粉乳)를 농도 약 1 질량%의 전분유(澱粉乳)로 하고, 여기에 최종 농도 1mM이 되도록 염화 칼슘을 가하고, pH 6.0으로 조정하여, 95℃에서 약 20분간 가열해서 호화(糊化)를 한 후에 약 40℃로 냉각하고, 여기에 실시예 1의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 생성효소를 함유하는 농축 효소액을 전분 고형물 1 그램당 0.26ml(약 1 단위)의 비율이 되도록 가하고, pH 6.0, 온도 40℃에서 48시간 반응시켰다. 그 반응액을 95℃로 가열해서 30분간 유지한 후, 냉각하고, 여과해서 얻어지는 여액을, 통상적인 방법에 따라 활성탄으로 탈색하고, H형 및 OH형 이온교환 수지에 의해 탈염해서 정제하고, 더욱 농축해서 농도 65 질량%의 환상 말토실 말토오스 함유 시럽을 고형물당 수율 약 90%로서 얻었다. 이 제품은, 고형물당, 환상 말토실 말토오스 31.4 질량%, 말토오스 2.2 질량%, 말토티리오스 1.5 질량%, 및 그 밖의 당질을 65.9 질량% 함유하고 있고, 저(低)환원성이며, 온화한 감미, 적당한 점도, 보습성, 포접성을 가지므로, 감미료, 정미 개량제, 품질 개량제, 이수 방지제, 안정제, 변색 방지제, 부형제, 포접제, 분말화 기재(基材) 등으로서, 각종 음식물, 화장품, 의약품 등의 각종 조성물에 유리하게 이용할 수 있다.

[0298] 실시예 3

[0299] 타피오카 전분을 농도 약 1 질량% 전분유(澱粉乳)로 하고, 여기에 농도 0.1 질량%가 되도록 탄산 칼슘을 가하고, pH 6.0으로 조정하여, 여기에 α-아밀라아제(노보사 제조, 상품명 『타마밀 60L』)를 전분 고형물 그램당 0.2 질량%가 되도록 가하고, 95℃에서 10분간 반응시킨 다음에 120℃에서 20분간 오토클레이브하고, 약 40℃로 급랭해서 DE 약 3의 액화 용액을 얻고, 여기에 실시예 1의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 생성효소를 함유하는 농축액을 전분 고형물 1 그램당 0.26ml(약 1 단위)와 이소아밀라아제(일본국의 주식회사 林原 생물화학연구소 제조)를 전분 고형물 1 그램당 1000 단위의 비율이 되도록 가하고, pH 6.0, 온도 40℃에서 48시간 반응시켰다. 그 반응액을 95℃로 가열해서 30분간 유지한 후, 냉각하고, 여과해서 얻어지는 여액을, 통상적인 방법에 따라, 활성탄으로 탈색하고, H형 및 OH형 이온교환 수지에 의해 탈염해서 정제하여 더욱 농축함으로써, 고형물당 환상 말토실 말토오스를 41.1% 함유하는 농도 60 질량%의 시럽을 얻었다. 얻어진 시럽을 당액으로 해서, 강산성 캐타이온(cation) 교환 수지(엠버라이트 CR-1310, Na형, 오르가노 주식회사 제조)를 사용한 칼럼 분획을 하였다. 수지를 내경 5.4cm의 재킷 부착 스테인레스제 칼럼 4개에 충전하고, 직렬로 연결하여 수지층 전장(全長) 20m로 하였다. 칼럼 내 온도를 60℃로 유지하면서, 당액을 수지에 대하여 5v/v% 첨가하고, 여기에 60℃의 온수를 SV 0.13으로 흘려서 분획하고, 용출액의 당조성을 HPLC법으로 모니터하여 환상 말토실 말토오스 함유 회분을 함유하는 저분자 회분을 채취하고, 정제하여 농축하고, 분무건조함으로써 환상 말토실 말토오스 함유 분말을 고형물당 수율 약 54%로서 얻었다. 이 제품은, 고형물당, 환상 말토실 말토오스 63.2 질량%, 말토오스 7.4 질량%, 말토티리오스 6.2 질량%, 및 그 밖의 당질을 23.2 질량% 함유하고 있고, 저(低)환원성이며, 온화한 감미, 적당한 점도, 보습성, 포접성을 가지므로, 감미료, 정미 개량제, 품질 개량제, 이수 방지제, 안정제, 변색 방지제, 부형제, 포접제 등으로서, 각종 음식물, 화장품, 의약품 등의 각종 조성물에 유리하게 이용할 수 있다.

[0300] 실시예 4

[0301] 옥수수 전분을 농도 약 1 질량% 전분유(澱粉乳)로 하고, 여기에 농도 0.1 질량%가 되도록 탄산 칼슘을 첨가하고, pH 6.0으로 조정하여, 여기에 α-아밀라아제(상품명 『네오스피타제』, 일본국의 나가세 생화학 공업 주식회사제)를 전분 고형물 그램당 0.2%가 되도록 가하여 85 내지 90℃에서 20분간 반응시킨 다음에 120℃에서 20분간 오토클레이브하고, 약 40℃로 급랭해서 DE 약 3의 액화 용액을 얻고, 여기에 실시예 1의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 생성효소를 함유하는 농축액을 전분 고형물 1 그램당 0.26ml(약 1 단위)와 이소아밀라아제(일본국의 주식회사 林原 생물화학 연구소 제조)를 전분 고형물 1 그램당 1000 단위의 비율이 되도록 가하여,

pH 6.0, 온도 40℃에서 48시간 반응시켰다. 그 반응액을 95℃로 가열해서 30분간 유지한 후, pH 5.0, 온도 50℃로 하고, 거기에 글루코아밀라아제(상품명 『글루코탐』, 일본국의 나가세 생화학 공업 주식회사제)를 전분 1그램당 100 단위의 비율이 되도록 가하고, pH 5.0, 온도 50℃에서 16시간 반응시켰다. 그 반응액을 95℃로 가열해서 30분간 유지한 후, 냉각하고, 여과해서 얻어지는 여액을, 통상적인 방법에 따라, 활성탄으로 탈색하고, H형 및 OH형 이온교환 수지에 의해 탈염해서 정제하고, 더욱 농축하여 농도 60 질량%의 환상 말토실 말토오스 함유 시럽을 고형물당 수율 약 95%로서 얻었다. 이 제품은, 고형물당, 환상 말토실 말토오스 42.6 질량%, 글루코오스 53.0 질량%, 및 그 밖의 당질을 4.4 질량% 함유하고 있고, 온화한 감미, 적당한 점도, 보습성, 포집성을 가지므로, 감미료, 정미 개량제, 품질 개량제, 이수 방지제, 안정제, 변색 방지제, 부형제, 포집제, 분말화 기재 등으로서, 각종 음식물, 화장품, 의약품 등의 각종 조성물에 유리하게 이용할 수 있다.

[0302] 실시예 5

[0303] 실시예 4의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 시럽을, 통상적인 방법에 따라, 수소첨가해서 환원성 당질을 당 알코올화하여 정제하고, 농축해서 진공건조하고, 분쇄하여 환상 말토실 말토오스 함유 분말을 고형물당 수율 약 90%로서 얻었다. 이 제품은, 고형물당, 환상 말토실 말토오스 42.6 질량%, 소르비톨 53.2 질량%, 및 그 밖의 당 알코올을 4.2 질량% 함유하고 있어, 실질적으로 환원력을 나타내지 않고, 아미노카르보닐 반응을 일으키기 어려우며, 저(低)환원성이고, 온화한 감미, 적당한 점도, 보습성, 포집성을 가지므로, 감미료, 정미 개량제, 품질 개량제, 이수 방지제, 안정제, 변색 방지제, 부형제, 포집제 등으로서, 각종 음식물, 화장품, 의약품 등의 각종 조성물에 유리하게 이용할 수 있다.

[0304] 실시예 6

[0305] 실시예 4의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 시럽을 원당액(原糖液)으로 하고, 환상 말토실 말토오스의 함량을 높이기 위해서, 실시예 3의 방법에 준해서 염형 강산성 캐타이온 교환 수지를 사용하는 칼럼 크로마토그래피를 하여 환상 말토실 말토오스 고함유 획분을 채취하고, 정제함으로써, 고형물당 약 90 질량%의 환상 말토실 말토오스를 함유하고 있는 환상 말토실 말토오스 고함유액을 고형물당 수율 약 40%로서 얻었다. 이 용액을 농축하면서 연속 결정 석출시키고, 얻어지는 매스킷을 바스켓형 원심분리기에서 분밀(分蜜)하고, 결정을 소량의 물로 스프레이하여 세정하고, 온풍 건조함으로써, 고순도의 환상 말토실 말토오스 함유 결정을 고형물당 약 25%의 수율로서 얻었다. 이 제품은, 순도 99% 이상의 극히 순도가 높은 환상 말토실 말토오스 함유 결정이며, 환원성이 극히 낮고, 아미노카르보닐 반응을 일으키기 어려우며, 흡습성도 나타내지 않고, 취급이 용이하며, 온화한 낮은 감미, 적당한 점도, 보습성, 포집성, 난(難)소화성을 가지므로, 감미료, 저칼로리 식품소재, 정미 개량제, 풍미 개량제, 품질 개량제, 이수 방지제, 안정제, 변색 방지제, 부형제, 포집제, 분말화 기재 등으로서, 각종 음식물, 화장품, 의약품 등의 각종 조성물, 더욱이는 공업시약, 화학원료 등으로도 유리하게 이용할 수 있다.

[0306] 실시예 7 <감미료>

[0307] 실시예 6의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 결정 0.8 질량부에, 트레할로오스 함유 결정(일본국의 주식회사 林原상사 판매, 등록상표 『트레하』) 0.2 질량부, α-글리코실스테비오시드(일본국의 東洋精糖 주식회사 판매, 상품명 『αG 스위트』) 0.01 질량부, 및 L-아스파르트-L-페닐알라닌 메틸 에스테르(상품명 『아스파르테임』) 0.01 질량부를 균일히 혼합하고, 과립 성형기에서 과립상 감미료를 얻었다. 이 제품은, 감미의 질이 우수하고, 수크로오스의 약 2배의 감미도를 가지고 있다. 이 제품의 칼로리는, 환상 말토실 말토오스가 난소화성, 난발효성이어서 실질적으로 무(無)칼로리 내지 저칼로리이다. 더욱이 실온 보존 하에서도 변질 열화(劣化)의 우려가 없어 안정하다. 따라서, 이 제품은 고품질의 저칼로리, 낮은 충치 유발성 감미료로서 아주 적합하다.

[0308] 실시예 8 <하드 캔디>

[0309] 농도 55% 수크로오스 용액 100 질량부에 실시예 4의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 시럽 50 질량부를 가열 혼합하고, 이어서 감압 하에서 수분 2% 미만인 될 때까지 가열 농축하고, 여기에 시트르산 0.6 질량부 및 적당량의 레몬 향료와 착색료를 혼합하고, 통상적인 방법을 따라서 성형하여 제품을 얻었다. 이 제품은 씹기, 정미, 풍미도 양호하고, 수크로오스의 결정석출도 일으키지 않으며, 흡습성이 적고, 끈적거림도 일으키지 않는 안정하고 고품질의 하드 캔디이다.

[0310] 실시예 9 <츄잉 검>

[0311] 검 베이스 3 질량부를 유연해 질 정도로 가열 용융하고, 여기에 무수 말티톨 2 질량부, 크실리톨 2 질량부, 실시예 6의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 결정 2 질량부, 및 트레할로오스 함유 결정 1 질량부를 가

하고, 적당량의 향료와 착색료를 혼합하여, 통상적인 방법에 따라, 로울러에 의해 혼합하여, 성형, 포장해서 제품을 얻었다. 이 제품은, 텍스처, 정미, 풍미가 양호하고, 낮은 충치 유발성, 저칼로리의 휴잉 검으로서 아주 적합하다.

[0312] 실시예 10 <가당(加糖) 연유>

[0313] 원유(原乳) 100 질량부에 실시예 2의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 시럽 4 질량부 및 수크로오스 2 중량을 용해하고, 플레이트 히터에서 가열 살균하고, 이어서 농도 70%로 농축하여 무균상태로 통조림해서 제품을 얻었다. 이 제품은, 온화한 감미로서 풍미도 좋으므로, 프루츠, 커피, 코코아, 홍차 등의 조미용으로 유리하게 이용할 수 있다.

[0314] 실시예 11 <유산균 음료>

[0315] 탈지 분유 175 질량부, 실시예 3의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 분말 100 질량부 및 락토수크로오스 고탐유 분말(일본국의 주식회사 林原상사 판매, 등록상표 『乳果 올리고』)을 물 1,500 질량부에 용해하고, 65℃에서 30분간 살균하고, 40℃로 냉각 후, 여기에, 통상적인 방법에 따라, 유산균의 스타터를 30 질량부 식균(植菌)하고, 37℃에서 8시간 배양해서 유산균 음료를 얻었다. 이 제품은, 풍미 양호하고, 올리고당, 환상 말토실 말토오스를 함유하며, 유산균을 안정하게 유지할 뿐만 아니라, 비피더스균 증식 촉진 작용, 정장작용을 가진 유산균 음료로서 아주 적합하다.

[0316] 실시예 12 <분말 주스>

[0317] 분무건조에 의해 제조한 오렌지 과즙분말 33 질량부에 대하여, 실시예 6의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 결정 분말 50 질량부, 무수 결정 말티톨 10 질량부, 무수 시트르산 0.65 질량부, 말산 0.1 질량부, 2-O- α -글루코실 γ -아스코르브산 0.2 질량부, 시트르산 소다 0.1 질량부, 폴룰란 0.5 질량부 및 분말향료 적당량을 잘 혼합교반하고, 분쇄해서 미세한 분말로 하고, 이것을 유동층 조립기(造粒機)에 넣어서 배풍(排風) 온도 40℃로 하고, 여기에 실시예 2의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 시럽을 바인더로 하여 적당량 스프레이해서 30분간 조립(造粒)하고, 계량하고, 포장해서 제품을 얻었다. 이 제품은 과즙 함유율 약 30%의 분말 주스이다. 또한 이 제품은 이상한 맛, 이상한 냄새가 없고, 고품질이며, 저칼로리의 주스로서 상품가치가 높은 것이다.

[0318] 실시예 13 <커스터드 크림>

[0319] 콘 스타치 100 질량부, 실시예 2의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 시럽 100 질량부, 트레할로오스 함유 결정 60 질량부, 수크로오스 40 질량부, 및 식염 1 질량부를 충분히 혼합하고, 계란 280 질량부를 더해서 교반하고, 여기에 끓인 우유 1,000 질량부를 서서히 첨가하고, 다시 불에 올려서 교반을 계속하여 콘 스타치가 완전히 호화(糊化)해서 전체가 반투명해졌을 때에 불을 끄고, 이것을 냉각해서 적당량의 바닐라 향료를 가하여 계량, 충전, 포장해서 제품을 얻었다. 이 제품은 매끈매끈한 광택을 가지고, 풍미 양호하며, 전분의 노화도 억제되어, 고품질의 커스터드 크림이다.

[0320] 실시예 14 <우이로 노 모토(Uiro-no-moto)>

[0321] 쌀가루 90 질량부에, 콘 스타치 20 질량부, 무수 결정 말티톨 70 질량부, 실시예 5의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 분말 50 질량부, 및 폴룰란 4 질량부를 균일히 혼합해서 우이로 노 모토의 프리믹스를 제조하였다. 우이로 노 모토의 프리믹스와 적당량의 분말차와 물을 혼련하고, 이것을 용기에 넣어서 60분간 썰서 분말차 우이로를 제조하였다. 이 제품은, 광택이 나고, 입맛도 양호하며, 풍미도 좋다. 또한 전분의 노화도 억제되고, 보존성도 좋으며, 저칼로리의 우이로로서도 적합하다.

[0322] 실시예 15 <팔소>

[0323] 원료 팔 10 질량부에, 통상적인 방법에 따라 물을 가해서 펄펄 끓여서, 뚝은 맛을 우려내고, 수용성 협잡물을 제거하여, 팔알로 된 팔소 약 21 질량부를 얻었다. 이 생(生) 팔소에 수크로오스 14 질량부, 실시예 2의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 시럽 5 질량부와 물 4 질량부를 더해서 펄펄 끓이고, 여기에 소량의 셀러드 오일을 첨가해서 팔알이 부스러지지 않도록 반죽하여 제품인 팔소를 약 35 질량부 얻었다. 이 제품은 퇴색, 이수(離水)도 없고 안정하며, 맛, 풍미 양호하므로, 팔소 빵, 만두, 경단, 모나카, 빙과 등의 제과 재료로서 적합하다.

[0324] 실시예 16 <빵>

[0325] 밀가루 100 질량부, 이스트균 2 질량부, 수크로오스 5 질량부, 실시예 3의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스

함유 분말 1 질량부 및 무기 푸드 0.1 질량부를 통상적인 방법에 따라 물로 반죽하여, 중중(中種)을 26℃에서 2 시간 발효시키고, 그 후 30분간 숙성하여 구웠다. 이 제품은 색상, 탈형도 양호하고, 적당한 탄력, 온화한 감미를 가진 고품질의 빵이다.

[0326] 실시예 17 <햄>

[0327] 돼지 넓적다리 고기 1,000 질량부에 식염 15 질량부 및 질산 칼륨 3 질량부를 균일히 갈아서 혼합하고, 냉실에서 하룻밤 퇴적한다. 이것을 물 500 질량부, 식염 100 질량부, 질산 칼륨 3 질량부, 실시예 5의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 분말 40 질량부 및 향신료로 된 염지액(鹽漬液)에 냉실에서 7일간 담그고, 이어서, 통상적인 방법에 따라 냉수로 세정하여, 끈으로 감아 매어 훈연(薰煙)하고, 쿠킹하여, 냉각, 포장해서 제품을 얻었다. 이 제품은 색조도 좋고, 풍미 양호한 고품질의 햄이다.

[0328] 실시예 18 <분말 펩티드>

[0329] 40% 식품용 대두 펩티드 용액(일본국의 不二製油 주식회사 판매, 상품명 『하이뉴토 S』) 1 질량부에, 실시예 6의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 결정 분말 2 질량부를 혼합하고, 플라스틱제 배트(vat)에 넣어 50℃에서 감압건조하고, 분쇄해서 분말 펩티드를 얻었다. 이 제품은 풍미 양호하여, 프리믹스, 빙과 등의 저칼로리 제과 재료로서 유용할 뿐만 아니라, 경구 유동식, 경관 유동식을 위한 난소화성의 식물(食物) 섬유, 정장제용으로서도 유용하다.

[0330] 실시예 19 <화장용 크림>

[0331] 모노 스테아르산 폴리옥시에틸렌 글리콜 2 질량부, 자기 유화형 모노스테아르산 글리세린 5 질량부, 실시예 6의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 결정 분말 2 질량부, α-글루코실 루틴(일본국의 주식회사 林原 판매, 상품명: αG 루틴) 1 질량부, 유동 파라핀 1 질량부, 트리옥탄산 글리세린 10 질량부 및 방부제 적당량을 통상적인 방법에 따라서 가열 용해하고, 여기에 L-락트산 2 질량부, 1,3-부틸렌 글리콜 5 질량부 및 정제수 66 질량부를 첨가하여 호모게나이저에서 유화하고, 다시 향료 적당량을 가해서 교반 혼합하여 화장용 크림을 제조하였다. 이 제품은 향산화성을 가지고, 안정성은 높으며, 고품질의 햇볕에 탐 방지, 피부 미화제, 색백제 등으로서 유리하게 이용할 수 있다.

[0332] 실시예 20 <치약>

[0333] 제2인산 칼슘 45 질량부, 라우릴 황산 나트륨 1.5 질량부, 글리세린 25 질량부, 폴리옥시에틸렌소르비탄 라우레이트 0.5 질량부, 실시예 5의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 분말 10 질량부, 사카린 0.02 질량부를 물 18 질량부와 혼합해서 치약을 얻었다. 이 제품은 계면 활성제의 세정력을 저하시키지 않고, 싫은 맛을 개량하여, 사용후감도 양호하다.

[0334] 실시예 21 <유동식용 고체 제제>

[0335] 실시예 3의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 분말 100 질량부, 트레할로오스 함유 결정 200 질량부, 말토테트라오스 고탍유 분말 200 질량부, 분말 난황 270 질량부, 탈지 분유 209 질량부, 염화 나트륨 4.4 질량부, 염화 칼륨 1.8 질량부, 황산 마그네슘 4 질량부, 티아민 0.01 질량부, L-아스코르브산 나트륨 0.1 질량부, 비타민 E 아세이트 0.6 질량부 및 니코틴산 아마이드 0.04 질량부로 된 배합물을 제조하고, 이 배합물 25그램씩을 방습성 라미네이트 작은 봉지에 충전하여 히이트 실(heat seal)해서 제품을 얻었다. 이 제품은 환상 말토실 말토오스에 의해 난소화성의 식물(食物) 섬유를 강화하고, 정장작용이 우수한 유동식으로 해서 경구적, 또는 비강, 위, 장 등에 경관적 사용 방법에 의해 이용되어 생체에너지 보급용으로 유리하게 이용할 수 있다.

[0336] 실시예 22 <정제>

[0337] 아스피린 50 질량부에 실시예 6의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 결정 분말 14 질량부, 콘 스타치 4 질량부를 충분히 혼합한 후, 통상적인 방법을 따라서 타정기에 의해 타정해서 두께 5.25mm, 1정(錠) 680mg의 정제를 제조하였다. 이 제품은 환상 말토실 말토오스의 부형성을 이용한 것으로서, 흡습성이 없고, 물리적 강도도 충분히 있으며, 더욱이 수중에서의 붕괴는 극히 양호하다.

[0338] 실시예 23 <외상 치료용 고약>

[0339] 실시예 6의 방법으로 얻은 환상 말토실 말토오스 함유 결정 분말 100 질량부 및 말토오스 300 질량부에, 요오드 3 질량부를 용해한 메탄올 50 질량부를 가하여 혼합하고, 또한 10w/v% 폴룰란 수용액 200 질량부를 가해서 혼합하여 적당한 펄집성과 부착성을 나타내는 외상 치료용 고약을 얻었다. 이 제품은 환상 말토실 말토오스에 의

해 요오드, 메탄올의 휘산을 방지하고, 경시 변화가 적은 상품 가치가 높은 고약이다. 또한 이 제품은 요오드에 의한 살균 작용뿐만 아니라, 말토오스에 의한 세포에의 에너지 보급체로서도 작용하므로 치유 기간이 단축되고, 창면(創面)도 깨끗하게 낫는다.

산업상 이용 가능성

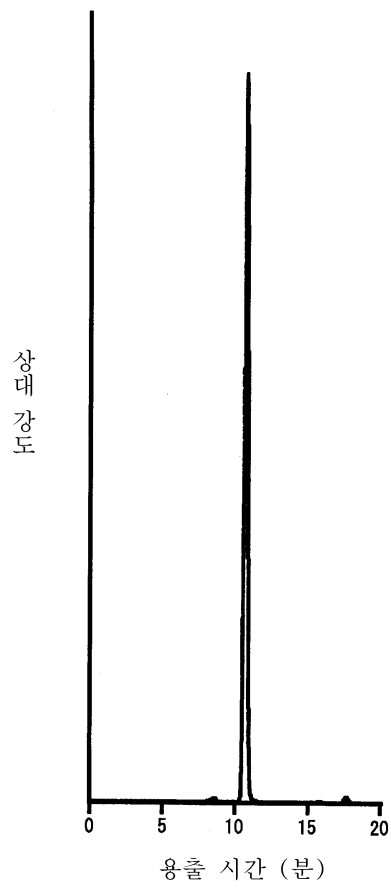
[0340] 본 발명에 의하면, 종래 미지였던 사이클로{→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→6)-α-D-글루코피라노실-(1→4)-α-D-글루코피라노실-(1→}의 구조를 가진 신규의 환상 당질, 즉 환상 말토실 말토오스를, 환상 말토실 말토오스 생성효소를 사용해서 대량으로 제조하여 제공할 수 있게 된다. 이 당질은 비환원성이기 때문에 아미노 화합물과의 사이에서 아미노카르보닐 반응(메일라아드 반응)을 일으켜서 갈변하는 일이 없고, 또한 환상 당질이기에 때문에 포접(包接) 능력을 가지고 있어, 포접한 화합물의 휘산을 억제하여 안정화할 수 있다. 신규의 환상 말토실 말토오스의 제공을 가능하게 하는 본 발명은, 음식물, 화장품, 의약품 등의 여러 가지 이용 분야에 공헌하게 되어, 그 산업적 의의는 극히 크다.

도면의 간단한 설명

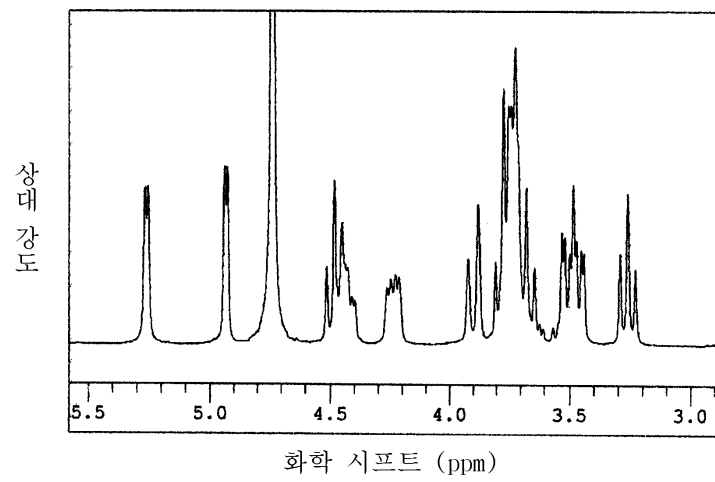
- [0011] 도 1은 비환원 당질 표품(標品)의 HPLC 용출 패턴을 나타내는 도면.
- [0012] 도 2는 단리한 비환원성 당질의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타내는 도면.
- [0013] 도 3은 단리한 비환원성 당질의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 나타내는 도면.
- [0014] 도 4는 본 발명의 환상 말토실 말토오스의 구조를 나타내는 도면.
- [0015] 도 5는 환상 말토실 말토오스 생성효소의 최적 온도를 나타내는 도면.
- [0016] 도 6은 환상 말토실 말토오스 생성효소의 최적 pH를 나타내는 도면.
- [0017] 도 7은 환상 말토실 말토오스 생성효소의 온도 안정성을 나타내는 도면.
- [0018] 도 8은 환상 말토실 말토오스 생성효소의 pH 안정성을 나타내는 도면.
- [0019] 도 9는 재조합 DNA, pBMB1을 나타내는 도면. 도면 중에서, 검은 굵은 선으로 나타낸 부분은 아스로박터 글로비포르미스 M6(FERM BP-8448) 유래의 본 발명의 환상 말토실 말토오스 생성효소를 코드하는 DNA이다.
- [0020] 도 10은 결정 환상 말토실 말토오스의 분말 X선 회절도를 나타내는 도면.
- [0021] 도 11은 결정 환상 말토실 말토오스의 열중량 곡선을 나타내는 도면.
- [0022] [부호의 설명]
- [0023] a: 1위치가 α-1,4 글루코시드 결합해 있는 글루코오스 잔기
- [0024] b: 1위치가 α-1,6 글루코시드 결합해 있는 글루코오스 잔기
- [0025] f1(+)-ori: f1 파아지 복제 기점
- [0026] Amp: 암피실린 내성 유전자
- [0027] ColE1 ori: 코리신 E1 복제 기점

도면

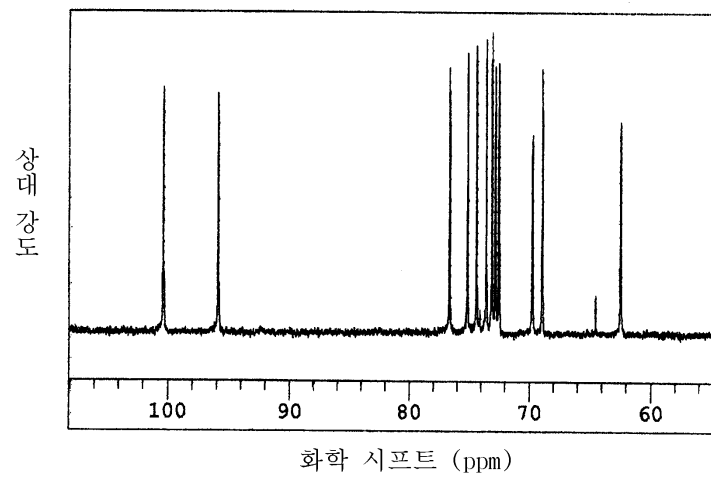
도면1



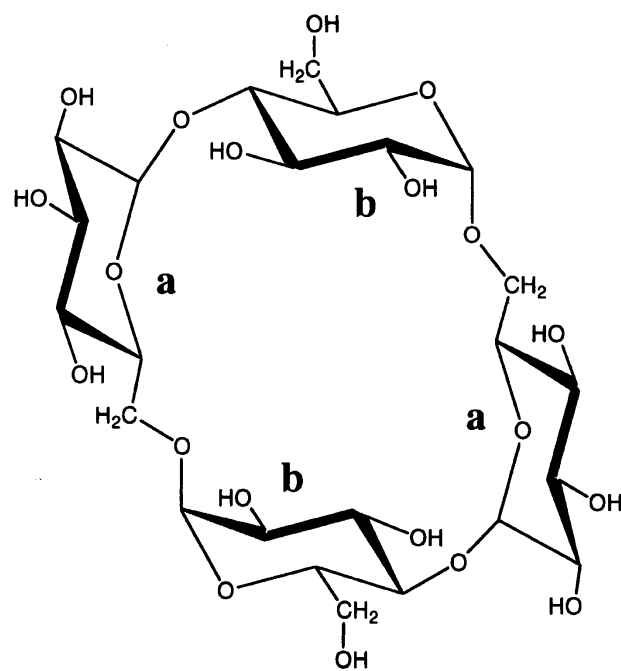
도면2



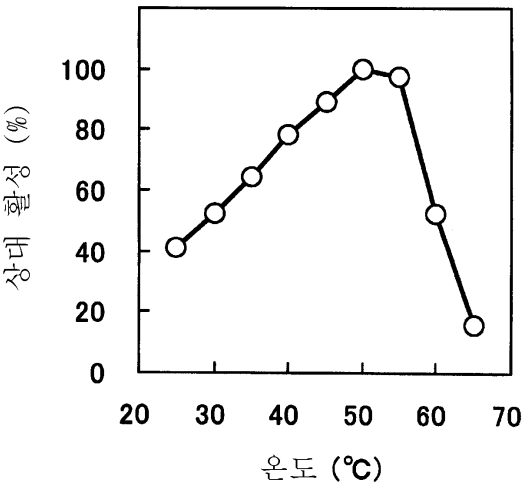
도면3



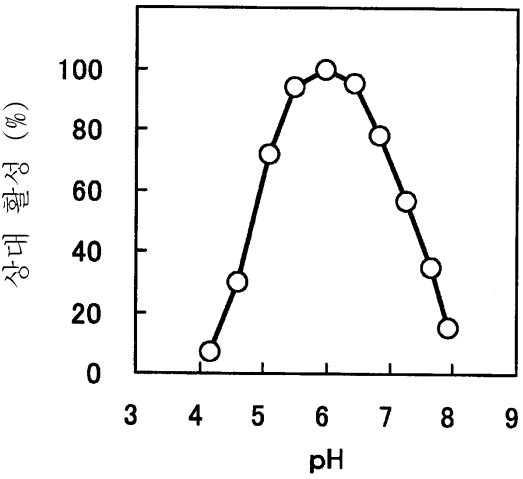
도면4



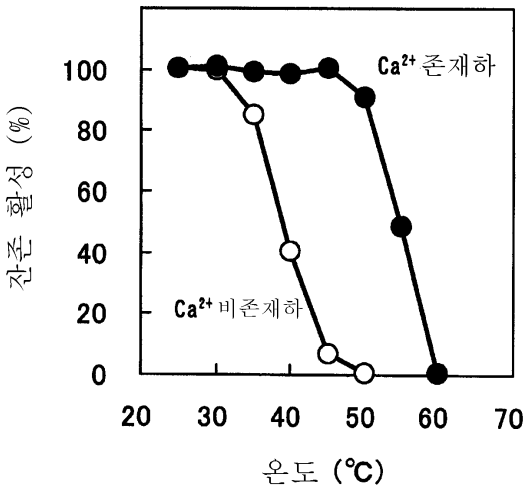
도면5



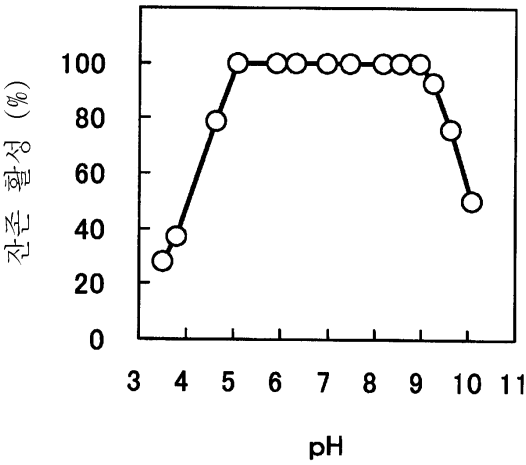
도면6



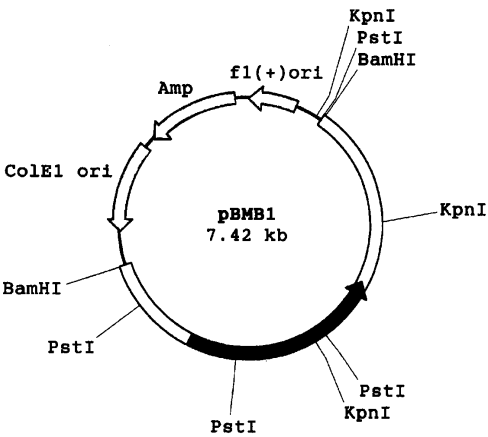
도면7



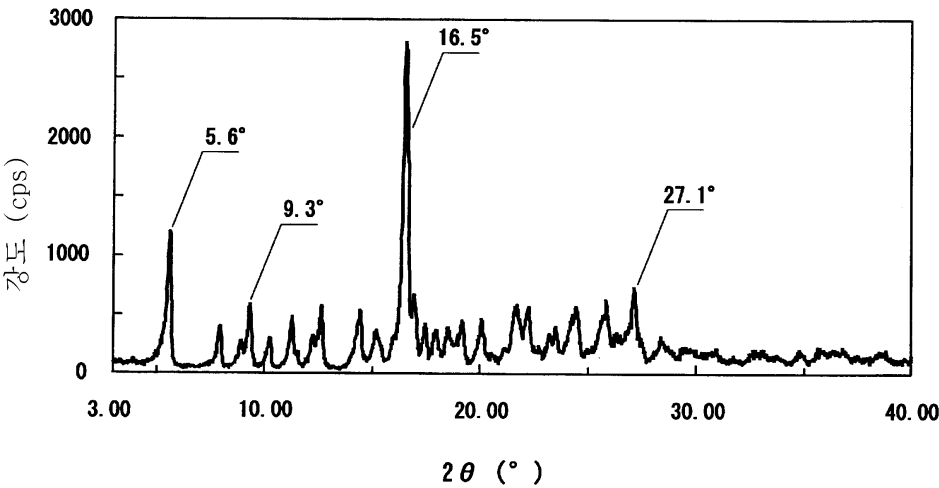
도면8



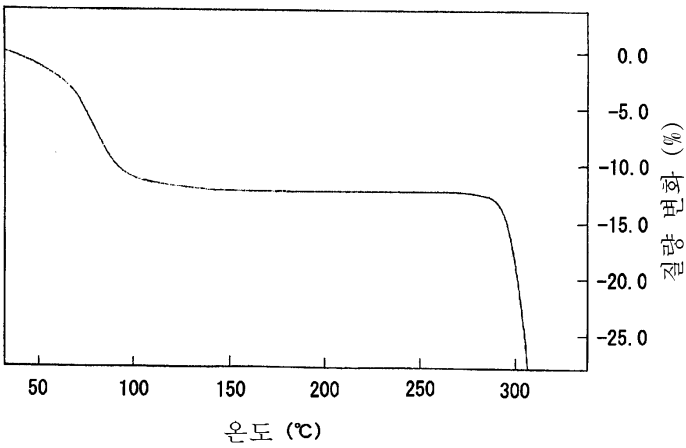
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Cyclic maltosyl maltose, cyclic maltosyl maltose synthase, method of producing the same and use thereof

<130> 10102802

<150> JP2003-304964

<151> 2003-08-28

<150> JP2004-174880

<151> 2004-06-14

<160> 10

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Arthrobacter globiformis

<400> 1

Asp Pro Thr Thr Ser

1

5

<210> 2
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 2
 Asp Pro Thr Thr Ser Pro Gly Pro Leu Ala Glu Gly Asp Val Ile Tyr
 1 5 10 15
 Gln Val Leu Val Asp Arg Phe Glu Asp Gly Asp Pro Thr Asn Asn Asp
 20 25 30
 Gln Gly Asp Gly Glu Tyr Asp Pro Ser Asp Leu Gly Phe Tyr His Gly
 35 40 45
 Gly Asp Trp Ala Gly Leu Thr Asp Arg Leu Asp Tyr Ile Ala Asp Leu
 50 55 60
 Gly Val Thr Ala Ile Trp Leu Ser Pro Val Ser Glu Gln Gln Pro Leu
 65 70 75 80
 Ser Arg Asp Gly Leu Glu Ala Ser Tyr His Gly Tyr Phe Thr Arg Asp
 85 90 95
 Phe Ala Thr Pro Asn Glu His Phe Gly Asp Arg Ala Glu Leu Gln Glu
 100 105 110
 Leu Ile Asp Thr Ala His Asp Leu Gly Leu Lys Met Ile Leu Asp Val
 115 120 125
 Val Pro Asn His Thr Ala Asp Tyr Leu Ala Gly Thr Ser Thr Thr Tyr
 130 135 140
 Ser Pro Ser Thr Tyr Lys Pro Ala Ser Pro Leu Asp Asp Ala Ser Tyr
 145 150 155 160
 Phe His His Ala Gly Asp Cys Leu Phe Asn Gly Leu Glu Thr Gln Thr
 165 170 175
 Gln Ile Glu Asn Cys Asp Leu Gly Gly Leu Asp Asp Leu Asp Gln Ser
 180 185 190
 Asn Pro Val Val Ser Ser His Leu Met Ser Thr Tyr Lys Asp Trp Val
 195 200 205
 Asp Met Gly Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Ala Arg Ser Val Pro
 210 215 220
 Lys Pro Trp Leu Ala Asp Phe Glu Ala Glu Met Gly Val Pro Thr Phe
 225 230 235 240
 Gly Glu Val Phe Val Gly Asp Val Asp Tyr Val Ser Glu Tyr Gln Asp
 245 250 255
 Tyr Glu Trp Gly Val Leu Asp Phe Pro Tyr Phe Phe Thr Val Arg Glu
 260 265 270
 Ala Phe Ser Ala Asp Thr Asp Met Asn Lys Leu Gly Asp Leu Phe Asp
 275 280 285
 Gln Asp Ser Lys Tyr Ala Asn Pro Asn Arg Leu Glu Thr Phe Leu Asp
 290 295 300
 Asn His Asp Arg Ala Arg Phe Leu Thr Trp Ala Asp Asp Asn Tyr Gln
 305 310 315 320
 Arg Leu Arg Ser Gly Leu Thr Phe Leu Leu Thr Ser Arg Gly Val Pro
 325 330 335
 Val Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Ala Asp Asp Gly Asn Gly Asn Pro
 340 345 350

Tyr Glu Val Pro Ile Ala Asn Lys Asp Asn Arg Lys Asp Met Glu Ser

355 360 365
Phe Asp Gln Asn Ser Asn Leu Tyr Lys His Ile Gln Arg Leu Thr Ala
370 375 380
Ile Lys Ala Ala Tyr Pro Ala Leu Gln Val Gly Thr Gln Arg Glu Met
385 390 395 400
Trp Ser Asp Thr Ser Val Tyr Gly Phe Ser Arg Arg Val Asp Ser Thr
405 410 415
Gly Ala Glu Ala Met Thr Phe Ser Ser Asn Ser Trp Thr Thr Gln Thr
420 425 430

Arg Thr Val Pro Leu Arg Ala Glu Ser Ser Ile Thr Val Gly Thr Thr
435 440 445
Leu Thr Asn Leu Met Asn Thr Gly Asp Thr Val Thr Val Thr Ala Gly
450 455 460
Gly Val Thr Gly Lys Gln Ile Thr Val Ser Leu Gly Glu His Glu Ser
465 470 475 480
Lys Val Tyr Ala Pro Gly Thr Pro Val Ser Ala Tyr Ser Pro Glu Ala
485 490 495
Arg Asn Thr Thr Lys Ile Arg Val His Tyr Asn Val Gly Leu Gly His

500 505 510
Ser Ile Ala Ile Arg Gly Asp Glu Tyr Pro Phe Thr Trp Thr Ser Gly
515 520 525
Arg Gly Ala Arg Asn Val Ala Ser Asp Val Trp Glu Phe Glu Val Glu
530 535 540
Arg Ile Pro Asp Gly Glu Thr Phe Gln Phe Lys Pro Leu Ile Asp Asp
545 550 555 560
Val Thr Trp Ser Thr Gly Gly Asn Phe Thr Gly Thr Gly Gly Asp Val
565 570 575

Ile Asp Ile Tyr Pro Thr Phe
580 583

<210> 3

<211> 1749

<212> DNA

<213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 3

gacccacca cgtcgcccgg cccgctggcc gagggcgacg tgatctacca ggtgctcgtc	60
gaccggttcg aagacggcga cccaccaac aacgaccagg gcgacggaga gtacgatccg	120
tccgacctcg gtttctacca cggcggcgac tggcggggcc tgacggaccg gctcgactac	180
atcgccgacg tgggtgtgac ggcgatctgg ctctcgcccg tctccgagca gcagccgctc	240
tcgcgcgacg ggctggaggc cagctaccac ggctacttca ctcgggactt cgcgacgccg	300
aacgagcatt tcggcgaccg agccgagctg caggagctga tcgacacggc gcacgatctc	360
ggactcaaga tgatcctcga cgtcgtgccg aaccacacgg ccgactacct cgcgggcaca	420
tcgacgacct attcgccgag cacctacaag ccggcgagtc cgctcgatga cgcgtcgtac	480
ttccatcacg ccggcgactg cctgttcaac gggtcgcaga cgcagacca gatcgagaac	540
tcgacacctg gcgggctcga cgacctcgat cagtcgaacc cggtcgtctc gtcgcacctg	600
atgagcacgt acaaggactg ggtcgacatg ggcttcgacg gcatccgggt cgatgcggcg	660
cgctcggtgc cgaagccgtg gctcgccgac ttcgaagccg agatgggctg gccgaccttc	720
ggcgaggtgt tcgtcggcga tgtcgactac gtctcgaggt accaggacta cgagtggggc	780

gtgctcgact tcccctactt cttcacgggtg cgcgaggcgt tctcggccga taccgacatg	840
aacaagctcg gcgacctctt cgaccaggac agcaagtacg cgaacccgaa ccggctggag	900
acgttcctcg acaaccacga tcgggcgcgg ttctcacct ggcccgatga caactatcag	960
cggtcgct caggactgac gtctctcta acctccggg gcgtgccgt gatctactac	1020
ggcaccgagc aggccgacga cggcaacggc aacccctacg aggtaccgat cgcgaacaag	1080
gacaaccgca aggacatgga gagcttcgat cagaactcga acctctacaa gcacatccag	1140
cggttgaccg cgatcaaggc cgcttaccg gctctgcagg tcggcacaca gcgcgagatg	1200
tggtcgaca cctccgtcta cgggttctcg cgacgcgtcg acagcacggg tgccgaggcg	1260
atgaccttct cgtcgaactc gtggacgacg cagacgcgca cggtgccgt gcgcgccgag	1320
agctcgatca cggtcggtac gacgtgacg aacctcatga acacggcgca cacggtgacc	1380
gtgaccgccg gcggtgtcac ggggaagcag atcacgtct ccctcggcga gcacgagagc	1440
aaggctctat cccccggcac cccgtatcg gcatacagcc ccgaagcgcg caacaccacg	1500
aagatccgcg tgactacaa cgtgggcctc gggcacagca tcgcgatccg cggcgacgag	1560
taccgttca cctggacctc cggccgaggc gcgcgcaacg tcgcgtccga cgtctgggag	1620
ttcgaggteg agcgcatccc cgacggtgag accttcagt tcaagcctct gatcgacgac	1680
gtcacctggt cgaccggcgg caacttcacc gggacggcg gcgacgtgat cgacatctac	1740
cccaccttc	1749

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Arthrobacter globiformis

<400> 4
 His Ile Gln Arg Leu Thr Ala Ile Lys
 1 5

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Arthrobacter globiformis

<400> 5
 Asp Met Glu Ser Phe Asp Gln Asn Ser Asn Leu Tyr Lys
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Arthrobacter globiformis

<400> 6
 Leu Gly Asp Leu Phe Asp Gln Asp Ser Lys
 1 5 10

<210> 7

<211> 27
 <212> PRT
 <213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 7
 Met Ile Leu Asp Val Val Pro Asn His Thr Ala Asp Tyr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Thr Thr Tyr Ser Pro Ser Thr Tyr Lys
 20 25

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 8
 Asp Trp Val Asp Met Gly Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Ala Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Pro Lys
 20

<210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 9
 Tyr Ala Asn Pro Asn Arg Leu Glu Thr Phe Leu Asp Asn His Asp Arg
 1 5 10 15
 Ala Arg Phe Leu Thr Trp Ala Asp Asp Asn Tyr Gln Arg Leu
 20 25 30

<210> 10
 <211> 4467
 <212> DNA
 <213> *Arthrobacter globiformis*

<400> 10
 ggatccctga gctggatggg catggctcac gcgctcgatc tcgagggggc ggcgaaggag 60
 ctggcgaccg cagccggcga ggcacctctc ctccgcccgg cgcacctcgt ctacctcggc 120
 gtcgatctcg cgcagacgac ggagggagaa cggtcgcagc gggaggcgct cgggctcgt 180
 gtcgtcgagc agaacgctct cgtcgccgat cctcggcgag ctgctcggac cgcacgagcc 240
 caactcgccc caggaccgtt catcgtgcac ctggacgtcg atgtgctgga ctctctcgac 300
 gcacccttg cagagaacgt gaacggccga aacagcgggc cgaccgtcga gcagctgcgg 360
 gtcgcactcg ccgagcttct gcagcatccg gactgctggg cgatgtccat cggccaggtg 420

 gtccccgcgc acgcgggcgc gcacccgacc tccatcccgc ggctcatcgg cgccctggcc 480
 gtgagctcca cgtagccgga cgtcgtctct ggagcggagc cgctccggca ggaacggcgt 540
 cgcaccccgt cgagcggggg cgtcgccctc ttgcacgggg tctgcggcgc ggctaccgcg 600
 gcggcagcgt gagccgccac cgaccagatc tcatgcatit ggacgaactt cgccgtccaa 660

ttctctccgc gctcaagca ggtatacatc gctcgaacgc gtcttcaactg gcctgacggt	720
ccgcgatcac gtcgtgcagt gaagcaccct gccgcgaagg gtcttgatgc gcatgcagta	780
cgggagtcga atcactttca cgggcacggc cgggtgcagt acttgacaaa acgcatttat	840
acatgttgca tcgatccagt aaaccgtgca gctcgcggac cgatgcgcat ccgacaacga	900
agtcaggaga gagtc atg aga acg aca gtt cgt acc gct cgc gtc tcc gcg	951
Met Arg Thr Thr Val Arg Thr Ala Arg Val Ser Ala	
1 5 10	
cgt acg ggc ctc gcg atg gga gca gcc gtc gcg ctg gcg gcc ggc gcg	999
Arg Thr Gly Leu Ala Met Gly Ala Ala Val Ala Leu Ala Ala Gly Ala	
15 20 25	
ctc acc tgg ggc acc ggc ccc gca ccc gcg agt gcc gac ccc acc acg	1047
Leu Thr Trp Gly Thr Gly Pro Ala Pro Ala Ser Ala Asp Pro Thr Thr	
30 35 40	
tcg ccc ggc ccg ctg gcc gag ggc gac gtg atc tac cag gtg ctc gtc	1095
Ser Pro Gly Pro Leu Ala Glu Gly Asp Val Ile Tyr Gln Val Leu Val	
45 50 55 60	
gac cgg ttc gaa gac ggc gac ccc acc aac aac gac cag ggc gac gga	1143
Asp Arg Phe Glu Asp Gly Asp Pro Thr Asn Asn Asp Gln Gly Asp Gly	
65 70 75	
gag tac gat ccg tcc gac ctc ggt ttc tac cac ggc ggc gac tgg gcg	1191
Glu Tyr Asp Pro Ser Asp Leu Gly Phe Tyr His Gly Gly Asp Trp Ala	
80 85 90	
ggc ctg acg gac cgg ctc gac tac atc gcc gat ctg ggt gtg acg gcg	1239
Gly Leu Thr Asp Arg Leu Asp Tyr Ile Ala Asp Leu Gly Val Thr Ala	
95 100 105	
atc tgg ctc tcg ccc gtc tcc gag cag cag ccg ctc tcg cgc gac ggg	1287
Ile Trp Leu Ser Pro Val Ser Glu Gln Gln Pro Leu Ser Arg Asp Gly	
110 115 120	
ctg gag gcc agc tac cac ggc tac ttc act cgg gac ttc gcg acg ccg	1335
Leu Glu Ala Ser Tyr His Gly Tyr Phe Thr Arg Asp Phe Ala Thr Pro	
125 130 135 140	
aac gag cat ttc ggc gac cga gcc gag ctg cag gag ctg atc gac acg	1383
Asn Glu His Phe Gly Asp Arg Ala Glu Leu Gln Glu Leu Ile Asp Thr	
145 150 155	

gcg cac gat ctc gga ctc aag atg atc ctc gac gtc gtg ccg aac cac Ala His Asp Leu Gly Leu Lys Met Ile Leu Asp Val Val Pro Asn His 160 165 170	1431
acg gcc gac tac ctc gcg ggc aca tcg acg acc tat tcg ccg agc acc Thr Ala Asp Tyr Leu Ala Gly Thr Ser Thr Thr Tyr Ser Pro Ser Thr 175 180 185	1479
tac aag ccg gcg agt ccg ctc gat gac gcg tcg tac ttc cat cac gcc Tyr Lys Pro Ala Ser Pro Leu Asp Asp Ala Ser Tyr Phe His His Ala 190 195 200	1527
ggc gac tgc ctg ttc aac ggg ctc gag acg cag acc cag atc gag aac Gly Asp Cys Leu Phe Asn Gly Leu Glu Thr Gln Thr Gln Ile Glu Asn 205 210 215 220	1575
tgc gac ctc ggc ggg ctc gac gac ctc gat cag tcg aac ccg gtc gtc Cys Asp Leu Gly Gly Leu Asp Asp Leu Asp Gln Ser Asn Pro Val Val 225 230 235	1623
tcg tcg cac ctg atg agc acg tac aag gac tgg gtc gac atg ggc ttc Ser Ser His Leu Met Ser Thr Tyr Lys Asp Trp Val Asp Met Gly Phe 240 245 250	1671
gac ggc atc cgg gtc gat gcg gcg cgc tcg gtg ccg aag ccg tgg ctc Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Ala Arg Ser Val Pro Lys Pro Trp Leu 255 260 265	1719
gcc gac ttc gaa gcc gag atg ggc gtg ccg acc ttc ggc gag gtg ttc Ala Asp Phe Glu Ala Glu Met Gly Val Pro Thr Phe Gly Glu Val Phe 270 275 280	1767
gtc ggc gat gtc gac tac gtc tcg gag tac cag gac tac gag tgg ggc Val Gly Asp Val Asp Tyr Val Ser Glu Tyr Gln Asp Tyr Glu Trp Gly 285 290 295 300	1815
gtg ctc gac ttc ccc tac ttc ttc acg gtg cgc gag gcg ttc tcg gcc Val Leu Asp Phe Pro Tyr Phe Phe Thr Val Arg Glu Ala Phe Ser Ala 305 310 315	1863
gat acc gac atg aac aag ctc ggc gac ctc ttc gac cag gac agc aag Asp Thr Asp Met Asn Lys Leu Gly Asp Leu Phe Asp Gln Asp Ser Lys 320 325 330	1911
tac gcg aac ccg aac cgg ctg gag acg ttc ctc gac aac cac gat cgg	1959

Tyr Ala Asn Pro Asn Arg Leu Glu Thr Phe Leu Asp Asn His Asp Arg 335 340 345	
gcg cgg ttc ctc acc tgg gcc gat gac aac tat cag cgg ctg cgc tca Ala Arg Phe Leu Thr Trp Ala Asp Asp Asn Tyr Gln Arg Leu Arg Ser 350 355 360	2007
gga ctg acg ttc ctc cta acc tcc cgg ggc gtg ccc gtg atc tac tac Gly Leu Thr Phe Leu Leu Thr Ser Arg Gly Val Pro Val Ile Tyr Tyr 365 370 375 380	2055
ggc acc gag cag gcc gac gac ggc aac ggc aac ccc tac gag gta ccg Gly Thr Glu Gln Ala Asp Asp Gly Asn Gly Asn Pro Tyr Glu Val Pro 385 390 395	2103
atc gcg aac aag gac aac cgc aag gac atg gag agc ttc gat cag aac Ile Ala Asn Lys Asp Asn Arg Lys Asp Met Glu Ser Phe Asp Gln Asn 400 405 410	2151
tcg aac ctc tac aag cac atc cag cgg ttg acc gcg atc aag gcc gct Ser Asn Leu Tyr Lys His Ile Gln Arg Leu Thr Ala Ile Lys Ala Ala 415 420 425	2199
tac ccg gct ctg cag gtc ggc aca cag cgc gag atg tgg tcc gac acc Tyr Pro Ala Leu Gln Val Gly Thr Gln Arg Glu Met Trp Ser Asp Thr 430 435 440	2247
tcc gtc tac ggg ttc tcg cga cgc gtc gac agc acg ggt gcc gag gcg Ser Val Tyr Gly Phe Ser Arg Arg Val Asp Ser Thr Gly Ala Glu Ala 445 450 455 460	2295
atg acc ttc tcg tcg aac tcg tgg acg acg cag acg cgc acg gtg ccg Met Thr Phe Ser Ser Asn Ser Trp Thr Thr Gln Thr Arg Thr Val Pro 465 470 475	2343
ctg cgc gcc gag agc tcg atc acg gtc ggt acg acg ctg acg aac ctc Leu Arg Ala Glu Ser Ser Ile Thr Val Gly Thr Thr Leu Thr Asn Leu 480 485 490	2391
atg aac acg ggc gac acg gtg acc gtg acc gcc ggc ggt gtc acg ggg Met Asn Thr Gly Asp Thr Val Thr Val Thr Ala Gly Gly Val Thr Gly 495 500 505	2439
aag cag atc acc gtc tcc ctc ggc gag cac gag agc aag gtc tat gcg Lys Gln Ile Thr Val Ser Leu Gly Glu His Glu Ser Lys Val Tyr Ala	2487

510	515	520	
ccc ggc acc ccg gta tcg gca tac agc ccc	Asn Leu		
480	485	490	
atg aac acg ggc gac acg gtg acc gtg acc gcc ggc ggt gtc acg ggg		2439	
Met Asn Thr Gly Asp Thr Val Thr Val Thr Ala Gly Gly Val Thr Gly			
495	500	505	
aag cag atc acc gtc tcc ctc ggc gag cac gag agc aag gtc tat gcg		2487	
Lys Gln Ile Thr Val Ser Leu Gly Glu His Glu Ser Lys Val Tyr Ala			
510	515	520	
ccc ggc acc ccg gta tcg gca tac agc ccc gaa gcg cgc aac acc acg		2535	
Pro Gly Thr Pro Val Ser Ala Tyr Ser Pro Glu Ala Arg Asn Thr Thr			
525	530	535	540
aag atc cgc gtg cac tac aac gtg ggc ctc ggg cac agc atc gcg atc		2583	
Lys Ile Arg Val His Tyr Asn Val Gly Leu Gly His Ser Ile Ala Ile			
545	550	555	
cgc ggc gac gag tac ccg ttc acc tgg acc tcc ggc cga ggc gcg cgc		2631	
Arg Gly Asp Glu Tyr Pro Phe Thr Trp Thr Ser Gly Arg Gly Ala Arg			
560	565	570	
aac gtc gcg tcc gac gtc tgg gag ttc gag gtc gag cgc atc ccc gac		2679	
Asn Val Ala Ser Asp Val Trp Glu Phe Glu Val Glu Arg Ile Pro Asp			
575	580	585	
ggt gag acc ttc cag ttc aag cct ctg atc gac gac gtc acc tgg tcg		2727	
Gly Glu Thr Phe Gln Phe Lys Pro Leu Ile Asp Asp Val Thr Trp Ser			
590	595	600	
acc ggc ggc aac ttc acc ggg acg ggc ggc gac gtg atc gac atc tac		2775	
Thr Gly Gly Asn Phe Thr Gly Thr Gly Gly Asp Val Ile Asp Ile Tyr			
605	610	615	620
ccc acc ttc tga accatccct ccggggactc caccgaaagg atgcttgtga gccac		2832	
Pro Thr Phe			
accatcgaac ggccctctcg cctcgacacg gcaaggcgcg ccttctcctg gcgcgacgcg		2892	
gtcgtctacc aggtctacct gcggtcgttc cgcgacgcga acggcgacgg catcgcgac		2952	
ctcggcgccc tgagccaggg tctcgacgcg atcgccgcac tcggctgcga cgccatctgg		3012	
ctgaaccctc gctacgcctc gcccagcgc gaccacgggt acgacatgc cgactacctg		3072	

acgatcgatc cggcgtacgg caccctcgag gatttcgacg aggtgggttcg cggagcgcac	3132
gagctcgggc tgcgcgttct gatggacatg gtcgcgaacc actgctcgtc cgaccacgcc	3192
tggttccagg cggcgttggc cgccgagccc ggccagcgacg agcgggcgcg cttcatcttc	3252
cgcgacggcc tcggccccga tggcgaactg ccgccgaaca actgggacag cgtcttcgga	3312
gggctcgcct ggacccgcgt caccgagcgc gacggacgcc ccgggcagtg gtacctccac	3372
tcctttgata cgagccagcc cgacttcgat tggcggcacc ccgcgggtggc cgagcacttc	3432
gagaacgtgc tgcggttctg gttcgagcgg ggagtcgacg gcttcgcat cgacgtcgcg	3492
cacggccact tcaaggacgc cgccctgcc gaccaccgg gtggccgggg gcctgacgcc	3552
ggccacaacc acggcatgtg ggaccagccc gaggtgcacg acctctatcg ctctgtggcga	3612
gcgctcggcg atgcctacga gcccgagaag tacttcgtgg gcgagatctg ggtccctcc	3672
cccgaaccggc tggccgacta cctgcgaccc gacgagctgc acaacgcctt ctctgttcgat	3732
ctgctcgtgc agccgtggaa cgccgaccgg ttccggaagg cgatcgagac cggactcgcc	3792
gtcggacgcg ggtggccggc ctggacactg gccaaaccag acgtgcatcg tgcggtcacc	3852
cgctacggcc aggagcagcc gttggatgaa gcctgccga ccgacatgat cgccgcggcg	3912
cgacgcaggg gcccggccga tctggatcgc ggtcttcgcc gtgcgcgcgc ggcagccgcc	3972
ctcgcctcgc cgtcccggg gtcgatgtac ctctatcagg gcgaagaact cgggttgccc	4032
gaggttctgg atctcccga tgtgcgcgc caagaccga tctggaccg ctgaaacggc	4092
accgagctcg gccgggacgg gtgccgcac cccctccct ggacgcgaga gggccgcacc	4152
ttcgattca gcgacgcgc cgccgccacg acctggctcc cgcagcccgc gtggttcggc	4212
gcgttcgcc gggcgacgca ggccggccgat cccgactcga tgcctcgcct gcacgcgat	4272
ctctcgcca cgcgcgcac ccacctccgc ggaacggagc cgatcgtctg gctgtccccg	4332
gcaggtgcc aggtgctcgc ctccgcacgc ggggacgtcg tggctgtcac gaacttcggc	4392
tccgcacct tcacgccgc gtccgcctgg ggcgcgtct cgcgcgtct ggcctcccag	4452
ccgtgacgg gatcc	4467