



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0066900
(43) 공개일자 2017년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 9/1051 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0173122

(22) 출원일자 2015년12월07일

심사청구일자 2015년12월07일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

심재훈

강원도 춘천시 지석로 67, 210동 201호

구예슬

서울특별시 강동구 명일로 74, 421동 1007호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 개선된 CGTase 변이효소를 이용한 고수율, 고순도 α-사이클로덱스트린의 수득방법

(57) 요약

본 발명은 개선된 CGTase 변이효소를 이용한 고수율, 고순도 α-사이클로덱스트린의 수득방법에 관한 것으로, 본 발명의 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소를 이용할 경우, α-사이클로덱스트린, β-사이클로덱스트린, γ-사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물 중 α-사이클로덱스트린(α-cyclodextrin, α-CD)만을 고수율, 고순도로 수득할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12P 19/04 (2013.01)

C12Y 204/01019 (2013.01)

C12Y 302/0102 (2013.01)

정우재

서울특별시 동대문구 천장산로11길 17, 204동 150
3호

(72) 발명자

김나리

인천광역시 서구 심곡로 135, 106동 403호

고담슬

강원도 동해시 청운1길 29, 17동 601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-D-0026-010105

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업 산학공동기술개발과제

연구과제명 효소공학적 방법을 이용한 알파 사이클로말토덱스트린의 정제법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 링크사업단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 변이효소.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소는,

야생형 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase)의 아미노산 서열 중 232번과 233번 아미노산이 N과 E로 치환된 것을 특징으로 하는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 변이효소.

청구항 3

α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD), β -사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD) 및 γ -사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, γ -CD)을 포함하는 혼합물에, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 첨가하여 반응시키는 것을 특징으로 하는 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)의 수득방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 반응은,

α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD), β -사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD) 및 γ -사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, γ -CD)을 포함하는 혼합물에 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 첨가하여 β -사이클로덱스트린 및 γ -사이클로덱스트린을 개환시키는 단계 (A);

개환된 β -사이클로덱스트린 및 γ -사이클로덱스트린을 가수분해시켜 글루코스(glucose)을 생성시키는 단계 (B); 및

상기 혼합물로부터 단계 (B)를 통해 생성된 글루코스(glucose)를 분리함으로써 α -사이클로덱스트린을 수득하는 단계 (C);를 포함하는 것을 특징으로 하는 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)의 수득방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 글루코스 생성을 위한 가수분해는,

α -글루코시다제(α -glucosidase, AMG)를 첨가하여 반응시키는 것을 특징으로 하는 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)의 수득방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 반응은,

30~60℃에서 1~24시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)의 수득 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CGTase 변이효소를 이용한 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)의 수득방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 변이효소를 이용해 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD), β -사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD) 및 γ -사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, γ -CD)을 포함하는 혼합물 중 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD) 만을 선택하여 수득하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] α -사이클로덱스트린(cyclodextrin)은 α -1,4 공유결합으로 연결된 6개의 글루코오스 단위로 구성되는 비 환원성 당질의 환상(環狀) 구조이다. α -사이클로덱스트린은 효소적 가수분해에 대해 높은 저항성을 가지고 있으므로, 식품 산업에서 특별한 응용성을 갖는다. 비록 곰팡이나 박테리아 유래의 알파 아밀레이즈는 α -사이클로덱스트린을 가수분해할 수 있지만, 인간의 침과 췌장의 아밀라아제는 α -사이클로덱스트린을 가수분해할 수 없다.

[0003] 따라서, α -사이클로덱스트린은 체내 생체 이용률을 감소시키고자 하는 목적으로 식품 및 음료에 응용되고 있는데, 체중 조절, 지질 및 당 대사 개선 등의 목적으로 사용된다. 그 외, α -사이클로덱스트린은 건조 혼합물, 구운 제품, 인스턴트 차, 커피와 같은 음식의 향, 색상, 감미료의 운반체로도 사용된다.

[0004] 한편, α -사이클로덱스트린은 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase)를 사용하여 전분으로부터 제조되는 것이 일반적인데, 이 반응에서는 α -사이클로덱스트린 외에 β -사이클로덱스트린, γ -사이클로덱스트린도 동시에 생산되는 문제가 있다. 따라서, 이들 β -사이클로덱스트린, γ -사이클로덱스트린으로부터 α -사이클로덱스트린을 선택적으로 분리하는 공정이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-1994-0024064호 (공개일자 1994.11.18)에는, 미생물의 발효에 의해 사이클로덱스트린(cyclodextrin) 생산효소인 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제(cyclodextrin glucanotransferase 2,4,1,19)를 제조함에 있어서, 양성전분(cationic starch)을 주탄소원으로 하는 변이주, 바실러스 마세란스(Bacillus macerans) KFCC-10789을 이용하는 것을 특징으로 하는 미생물에 의한 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제 효소의 제조방법이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허등록번호 제10-0136362호 (등록일자 1998. 01. 22)에는, 입자상을 갖는 변성전분 또는 일반 전분에서 선택된 기질을 녹인 전분액을 기질 전분액의 소화 개시온도보다 30℃ 낮은 온도에서, 소화 개시온도보다 10℃ 높은 온도 범위에서 열처리시키고, 사이클로덱스트린 생성반응 온도에서 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라아제(Cyclodextrin glucanotransferase)를 작용시켜 생성된 사이클로덱스트린 혼합액을 원심분리, 여과 등의 물리적 방법으로 미반응 전분을 제거시키는 기술에 대해 기재되어 있다.

(특허문헌 0003) 대한민국 특허등록번호 제10-0898384호 (등록일자 2009. 05. 12)에는, 당전이효소인 셀룰로버스 셀파타리쿠스 유래 내열성 당전이효소를 이용하여, 말토오실-베타-사이클로덱스트린으로부터 수용성이 증가된 다이말토오실-베타-사이클로덱스트린을 제조하는 기술에 대해 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 α -사이클로덱스트린, β -사이클로덱스트린 및 γ -사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물 중 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)만을 효과적으로 수득하는 방법을 개발하여 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glucanotransferase, CGTase) 변이효소를 제공한다.

[0008] 일반 야생형 CGTase의 경우는 다양한 종류의 올리고당을 반응 산물로 생산하는 반면, 본 발명의 상기 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소는 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)을 고수율, 고순도로 수득할 수 있다.

[0009] 한편, 본 발명의 상기 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소는, 야생형 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase)의 아미노산 서열 중 232번과 233번 아미노산이 N(Asn)과 E(Glu)로 치환된 것이다.

[0010] 한편, 본 발명은 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD), β -사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD) 및 γ -사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, γ -CD)을 포함하는 혼합물에, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 첨가하여 반응시키는 것을 특징으로 하는 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)의 수득방법을 제공한다.

[0011] 한편, 본 발명의 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD) 수득방법에 있어서, 상기 반응은 바람직하게 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD), β -사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD) 및 γ -사이클로덱스트린(γ -cyclodextrin, γ -CD)을 포함하는 혼합물에 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소를 첨가하여 β -사이클로덱스트린 및 γ -사이클로덱스트린을 개환시키는 단계 (A); 개환된 β -사이클로덱스트린 및 γ -사이클로덱스트린을 가수분해시켜 글루코스(glucose)을 생성시키는 단계 (B); 및 상기 혼합물로부터 단계 (B)를 통해 생성된 글루코스(glucose)를 분리함으로써 α -사이클로덱스트린을 수득하는 단계 (C);를 포함하는 과정으로부터 α -사이클로덱스트린을 수득하는 것이 좋다.

[0012] 한편, 본 발명의 α -사이클로덱스트린 수득방법에 있어서, 상기 글루코스 생성을 위한 가수분해는 바람직하게 α -글루코시다제(α -glucosidase, AMG)를 첨가하여 반응시키는 것이 좋다. 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase)도 가수분해 활성이 있으나, α -글루코시다제(α -glucosidase, AMG)를 추가로 첨가해 줄 경우, 가수분해 속도를 한층 증가시킬 수 있기 때문이다.

[0013] 한편, 본 발명의 α -사이클로덱스트린 수득방법에 있어서, 상기 단계 (B)의 글루코스(glucose)의 분리는 일 예로, 글루코스와 α -사이클로덱스트린의 수용성 차이를 이용할 수 있다.

[0014] 한편, 본 발명의 α -사이클로덱스트린 수득방법에 있어서, 상기 반응은 30~60℃에서 1~24시간 동안 수행한 후, 가열하여 반응을 정지시키는 것이 좋다. 가열을 하면 효소가 실활되어 반응이 정지된다. 가열시 온도는 효소 실활 온도 이상으로 수행하면 되는데, 일 예로는 반응액을 끓여 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에서와 같이, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소(CGTase)를 이용할 경우, α -사이클로덱스트린, β -사이클로덱스트린 및 γ -사이클로덱스트린을 포함하는 혼합물 중 α -사이클로덱스트린(α -cyclodextrin, α -CD)만을 고순도, 고수율로 수득할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 CGTaseH233Y 효소를 암호화하는 유전자가 삽입된 벡터 맵이다.

도 2는 시그널 펩타이드 포함 CGTaseH233Y 효소의 아미노산 서열이다.

도 3은 정제된 CGTaseH233Y 효소의 전기영동 사진이다.

도 4는 CGTaseNE 효소를 암호화하는 유전자가 삽입된 벡터 맵이다.

도 5는 CGTaseNE 효소의 아미노산 서열이다.

도 6은 정제된 CGTaseNE 효소의 전기영동 사진이다.

도 7은 제조예 1의 CGTaseH233Y 효소를 이용한 α -CD, β -CD, γ -CD 의 개환 실험 결과이다.

도 8은 제조예 2의 CGTaseNE 효소를 이용한 α -CD, β -CD, γ -CD 의 개환 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] α -CD는 식품산업에서 활용도가 높고, 여러 종류의 CD들 중 유일하게 유럽연합에서 GRAS로 인정되어 식이섬유 대체 물질로 각광받고 있다. 본 발명에서는 본 발명자가 이미 발명한 CGTase 변이효소, CGTaseH233Y의 특성이 개선된 새로운 CGTase 변이효소, 'CGTaseNE mutant'를 개발하였다.
- [0018] 기존에 발명된 효소(CGTaseH233Y; 대한민국 출원번호 10-2015-0052509)는, CGTase가 생산하는 α -, β -, γ -CD 혼합액에서 β -, γ -CD만을 선별적으로 가수분해하여 α -CD만을 남길 수 있어, 이를 통해 α -CD를 분리해 낼 수 있었다.
- [0019] 하지만, 본 발명자는 기발명된 효소가 장시간 반응시 α -CD도 다소 가수분해함을 확인하였고, 이를 극복할 수 있는 새로운 효소를 개발하고자 하였다. 그 결과, 기존의 CGTase 변이효소, CGTaseH233Y보다 성능이 개선된 효소인 CGTaseNE를 개발할 수 있었다.
- [0020] 동일한 조건에서 상기 두 효소를 각각의 CD와 반응 후 TLC 상에서 시간대 별로 반응 산물을 분석하였다. CGTaseH233Y 효소는 장시간 반응시 α -CD에서도 가수분해 반응이 일어나 α -CD가 감소함과 동시에 소량의 다당류가 생산됨을 알 수 있었다.
- [0021] 하지만, 본 발명의 CGTaseNE 효소 경우, 오버-나이트(over-night) 반응에서도 α -CD가 거의 가수분해되지 않은 반면, β -CD와 γ -CD는 개환하여 가수분해되는 것으로 확인되었다.
- [0022] 본 발명자가 기개발한 CGTaseH233Y 효소도 안정적이기는 하나, 대량공정 수행시 정확한 반응시간 제어라는 어려운 난제가 있으므로, 본 발명의 CGTaseNE 효소를 사용할 경우, 더욱 안정적으로 α -CD의 손실 없이, α -CD를 수득할 수 있는 것으로 판단된다.
- [0023] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0024] [제조예 1: 싸이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소, CGTaseH233Y의 제조]
- [0025] 본 제조예에서는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼레이즈(CGTase) 변이효소, CGTaseH233Y를 제조하고자 하였다.
- [0026] 호알칼리성 바실러스 균(*Bacillus* sp.) I-5로부터 유래한 CGTase 유전자의 특정부위변이(site-directed mutagenesis)를 위하여 하기 표 1의 프라이머들을 사용하였다. 돌연변이를 주기 위하여 원본 DNA(pR2CGT I-5)에 하기 표 1의 프라이머를 사용하여 95℃에서 2분 동안 1회 실시한 후, 95℃에서 30초, 53.5℃에서 45초, 72℃에서 7분을 30회 PCR을 실시하였다.

표 1

[0027]	정방향 프라이머(forward primer)	5'-GTC AAG TAT ACG CCA TTC GGC TGG-3'
	역방향 프라이머(reverse primer)	5'-GTT CGT ATA CGG TAA GCC GAC CG-3'

- [0028] 상기 반응이 끝난 후 PCR 산물을 벡터 (도 1)에 클로닝하고, CaCl_2 법을 이용하여 대장균(*E. coli*) MC1016에 형질전환 하였다. 형질전환 유전자를 지니는 대장균 균주를 스크리닝(screening) 하기 위하여 앰피실린 (최종농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유한 'LB agar' 배지에 평판 도말하여 내성을 지니는 균주를 선별하였다.

- [0029] 선별된 균주는 아미노산 서열 중 233번 아미노산이 His에서 Tyr로 변형된 상태의 돌연변이된 CGTase

(CGTaseH233Y)를 생산할 수 있는데, CGTaseH233Y는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는다 (도 2 참조). 도 1은 CGTaseH233Y 효소를 암호화하는 유전자가 삽입된 벡터 맵이고, 도 2는 시그널 펩타이드 포함 CGTaseH233Y 효소의 아미노산 서열이다.

[0030] 상기 선별된 균주를 1 L의 LB 배지에 접종하여 24시간 가량 37℃에서 교반(200 rpm)하여 키운 후, 원심분리기를 이용하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 다시 pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충용액에 재부유(resuspension)한 후, 초음파로 세포파쇄를 실시하였다.

[0031] 세포파쇄로부터 수득된 조효소액을 12,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이후, 상층액을 β-CD가 결합된 세파덱스 수지(sephadex resin)가 담긴 컬럼에 흡착시킨 후, 다시 1% β-CD를 포함하는 pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충용액을 주입하는 'β-CD 친화 크로마토그래피법'으로 정제하여 CGTaseH233Y를 수득하였다 (도 3 참조). 도 3은 정제된 CGTaseH233Y 효소의 전기영동 사진이다.

[0032] [제조예 2: 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소, CGTaseNE의 제조]

[0033] 본 제조예에서는 사이클로텍스트린 글루카노트랜스퍼레이즈 변이효소, CGTaseNE를 제조하고자 하였다.

[0034] 모든 실험 재료 및 방법은 상기 제조예 1에 준해 수행하였고, 예외적으로 CGTaseNE 돌연변이 효소를 만들기 위한 점 돌연변이 프라이머 서열 (point mutation primer sequence)은 하기 표 2에 기재된 서열을 사용하였다.

표 2

[0035]	정방향 프라이머(forward primer)	5-GAC GCG GTC AAC GAA ACG CCA TTC GGC TGG-3
	역방향 프라이머(reverse primer)	5-GAA TGG CGT TTC GTT GAC CGC GTC CAC GCG-3

[0036] 실험결과, CGTase 돌연변이 효소로, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 CGTaseNE를 수득할 수 있었다. 도 4는 CGTaseNE 효소를 암호화하는 유전자가 삽입된 벡터 맵이고, 도 5는 CGTaseNE 효소의 아미노산 서열이다. 도 5에서 밑줄 친 부분이 돌연변이된 아미노산 서열이다. 야생형은 232번과 233번 아미노산이 K(Lys)와 H(His)이었으나, 본 돌연변이 효소에서는 각각 N(Asn)과 E(Glu)로 치환되었다. 도 6은 정제된 CGTaseNE 효소의 전기영동 사진이다.

[0037] [실시예 1: 제조예 1의 CGTaseH233Y 효소를 이용한 α-CD, β-CD, γ-CD의 개환 및 분해 실험]

[0038] 본 실험예에서는 상기 제조예 1에서 수득한 CGTaseH233Y 효소의 반응 시간 경과에 따른, α-CD, β-CD 및 γ-CD의 반응(개환 및 분해) 여부를 확인하고자 하였다.

[0039] pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충용액에, α-CD, β-CD, γ-CD (1%)와 상기 제조예 1에서 수득한 CGTaseH233Y 효소 22.6 μL(0.08779 unit, 1.8 mg/mL)를 각각 넣고, 45℃에서 하기 표 3에 기재된 시간으로 각각 반응시킨 후, 5분간 끓여 반응을 정지하였다. 이후, TLC 분석을 실시하였다. 하기 표 3은 각 샘플별 처리 조건을 정리해서 보여준다. 본 실험예 및 하기 실험예에서 사용한 TLC의 전개용매 조건은 모두 'n-butanol:ethanol:water' (5:5:3, v/v/v)로 하였다.

표 3

[0040]	NO.	CGTaseH233Y	사이클로텍스트린	시간 (h)
--------	-----	-------------	----------	--------

lane 1	22.6 μ L(0.08779 unit, 1.8 mg/mL)	α -CD 1%	control
lane 2			1
lane 3			3
lane 4			5
lane 5			7
lane 6			9
lane 7			12
lane 8			over-night
lane 9		β -CD 1%	control
lane 10			1
lane 11			3
lane 12			5
lane 13			7
lane 14			9
lane 15			12
lane 16			over-night
lane 17		γ -CD 1%	control
lane 18			1
lane 19			3
lane 20			5
lane 21			7
lane 22			9
lane 23			12
lane 24			over-night

[0041] 실험결과, 도 7에서 보는 바와 같이, CGTaseH233Y 효소는 β -CD, γ -CD를 모두 개환시키고, 분해하는 것으로 확인되었다. 하지만, 5시간이 경과하면서 α -CD도 일부 가수분해되는 것으로 나타났고, 시간이 경과함에 따라, 그 분해율은 더욱 증가하는 것으로 나타났다.

[0042] **[실시예 2: 제조예 2의 CGTaseNE 효소를 이용한 α -CD, β -CD, γ -CD의 개환 및 분해 실험]**

[0043] 본 실험예에서는 상기에 제조예 2에서 수득한 CGTaseNE 효소의 반응 시간 경과에 따른, α -CD, β -CD 및 γ -CD의 반응(개환 및 분해) 여부를 확인하고자 하였다.

[0044] pH 6.0의 50 mM NaOAc 완충용액에, α -CD, β -CD, γ -CD (1%)와 상기 제조예 1에서 수득한 CGTaseNE 효소 22.6 μ L(0.08779 unit, 1.8 mg/mL)를 각각 넣고, 45℃에서 하기 표 4에 기재된 시간으로 각각 반응시킨 후, 5분간 끓여 반응을 정지하였다. 이후, TLC 분석을 실시하였다. 하기 표 3은 각 샘플별 처리 조건을 정리해서 보여준다. 본 실험예 및 하기 실험예에서 사용한 TLC의 전개용매 조건은 모두 'n-butanol:ethanol:water' (5:5:3, v/v/v)로 하였다.

표 4

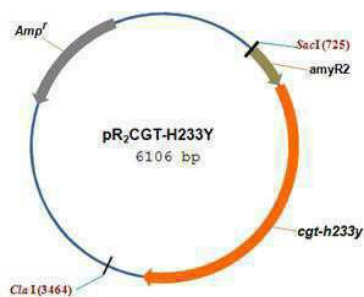
[0045]	NO.	CGTaseNE	사이클로덱스트린	시간 (h)
--------	-----	----------	----------	--------

lane 1	22.6 μ L(0.08779 unit, 1.8 mg/mL)	α -CD 1%	control
lane 2			1
lane 3			3
lane 4			5
lane 5			7
lane 6			9
lane 7			12
lane 8			over-night
lane 9		β -CD 1%	control
lane 10			1
lane 11			3
lane 12			5
lane 13			7
lane 14			9
lane 15			12
lane 16			over-night
lane 17		γ -CD 1%	control
lane 18			1
lane 19			3
lane 20			5
lane 21			7
lane 22			9
lane 23			12
lane 24			over-night

- [0046] 실험결과, 도 8에서 보는 바와 같이, CGTaseNE 효소는 β -CD, γ -CD를 모두 개환시키고, 분해하는 것으로 확인되었다.
- [0047] 그런데, CGTaseNE는 상기 제조예 1의 CGTaseH233Y와 달리, 시간이 경과하여도 α -CD를 개환 및 가수분해하지 않았으며, 심지어 오버-나이트 조건에서도 개환 및 분해를 거의 하지 않았다.
- [0048] 따라서, 본 발명의 CGTaseNE 효소를 이용할 경우, 세부적인 공정조건(일 예로, 반응시간)의 섬세한 설정 없이도, α -CD를 고순도, 고수율로 생산할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

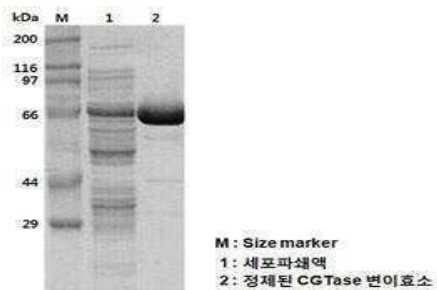


도면2

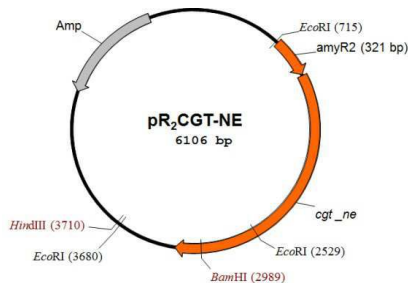
MKRFMKLTAVVTLWLSLTLGLLSPVHAAPDTSVSNKQNFSTDVIYQIFTDRFSDGNPANNPTGAAFDGSCTNLRLYCGGDWQGIINKINDGYLTGMGITAIWISQPVENIYSVINYSGVHNTAYHGYWARDFKKTNPAYGTMQDFKNLIDTAHAHNKVIDFAPNHTSPASSDDPSFAENGRLYDNGNLLGGYTNDTQNLFFHHYGGTDFSTIENG IYKNLYDLADLNHNNSVDVYLKDAIKMWLDLGVDGIRVDAVKYMPFGWQKSFMSSTINNYKPVFTFGEWFLGVNEISPEYHQFANESGMSLLDFRFAQKARQVFRDNTDNMYGLKAMLEGSEVDYAQVNDQVTFI DNHDMERFHTSNGDRRKLEQALAFTLTSRGVPAIYYGSEQYMSGGNDPDNRARIPSFSTTTTAYQVIQKL APLRKS NPAIAYGSTQERWINNDVIIYERKFGNNVAVVAINRNMNTPASITGLVTSLPQGSYNDVLGGILNG NTLTVGAGGAASNFTLAPGGTAVWQYTTDATAPIIGNVGPMMAKPGVTITIDGRASARQGT VYFGTTAVTGADIVAWEDTQIQVKILRVPGGIYDIRVANAAGAASNIYDNFEVLTGDQVTVRFVINNATTALGQNVFLT GNVSELGNWDPNNAIGPMYNQVVYQYPTWYYDVSVPAGQTIEFKFLKKQGSTVTWEGGANRTFTTPTS GTATVNVNWQP

*중간에 붉은색의 233번Y(Tyr)가 변이된 아미노산임. 밑줄친 부분은 signal peptide 부위로서, 발현 이후 세포막을 통과하는 동안 제거가 되는 부위이므로 염기서열 순서에서 제외됨

도면3



도면4



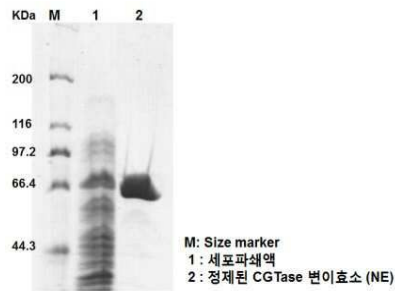
도면5

APDTSVSNKQNFSTDVIYQIFTDRFSDGNPANNPTGAAFDGSCTNLRLYCGGDWQGIINKINDGYLTGMGITAIWISQPVENIYSVINYSGVHNTAYHGYWARDFKKTNPAYGTMQDFKNLIDTAHAHNKVIDFAPNHTSPASSDDPSFAENGRLYDNGNLLGGYTNDTQNLFFHHYGGTDFSTIENG IYKNLYDLADLNHNNSVDVYLKDAIKMWLDLGVDGIRVDAVNEMPFGWQKSFMSSTINNYKPVFTFGEWFLGVNEISPEYHQFANESGMSLLDFRFAQKARQVFRDNTDNMYGLKAMLEGSEVDYAQVNDQVTFIDNHDMERFHTSNGDRRKLEQALAFTLTSRGVPAIYYGSEQYMSGGNDPDNRARIPSFSTTTTAYQVIQKLAPLRKS NPAIAYGSTQERWINNDVIIYERKFGNNVAVVAINRNMNTPASITGLVTSLPQGSYNDVLGGILNGNTLTVGAGGAASNFTLAPGGTAVWQYTTDATAPIIGNVGPMMAKPGVTITIDGRASARQGT VYFGTTAVTGADIVAWEDTQIQVKILRVPGGIYDIRVANAAGAASNIYDNFEVLTGDQVTVRFVINNATTALGQNVFLT GNVSELGNWDPNNAIGPMYNQVVYQYPTWYYDVSVPAAGQTIEFKFLKKQGSTVTWEGGANRTFTTPTSGTATVNVNWQP

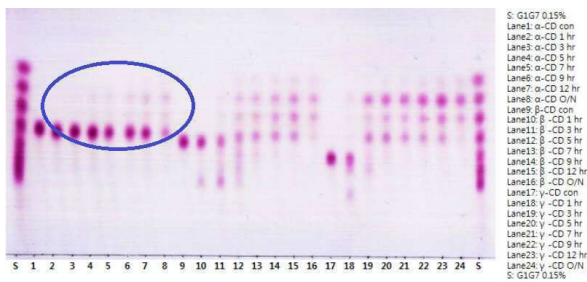
밑줄 친 부분이 mutation된 amino acid 서열임.

232번과 233번 아미노산이 wild type은 K와 H이었으나 각각 N과 E로 치환되었음.

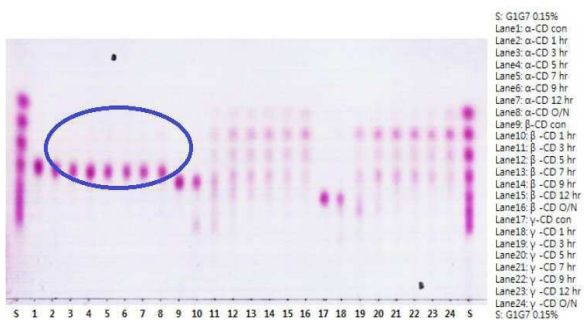
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Method for production of alpha-cyclodextrin by advanced CGTase mutant with high yield and high purity
- <130> AP-2015-0237
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 685
- <212> PRT
- <213> Bacillus sp. I-5

<400> 1

Ala Pro Asp Thr Ser Val Ser Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val

1 5 10 15

Ile Tyr Gln Ile Phe Thr Asp Arg Phe Ser Asp Gly Asn Pro Ala Asn

20 25 30

Asn Pro Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Ser Cys Thr Asn Leu Arg Leu

35 40 45

Tyr Cys Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asn Lys Ile Asn Asp Gly

50 55 60

Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Ser Gln Pro Val

65 70 75 80

Glu Asn Ile Tyr Ser Val Ile Asn Tyr Ser Gly Val His Asn Thr Ala

85 90 95

Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Ala Tyr

100 105 110

Gly Thr Met Gln Asp Phe Lys Asn Leu Ile Asp Thr Ala His Ala His

115 120 125

Asn Ile Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala

130 135 140

Ser Ser Asp Asp Pro Ser Phe Ala Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn

145 150 155 160

Gly Asn Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Gln Asn Leu Phe His

165 170 175

His Tyr Gly Gly Thr Asp Phe Ser Thr Ile Glu Asn Gly Ile Tyr Lys

180 185 190

Asn Leu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Ser Val Asp

195 200 205

Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ile Lys Met Trp Leu Asp Leu Gly Val Asp

210 215 220

Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Lys Tyr Met Pro Phe Gly Trp Gln Lys

225 230 235 240

Ser Phe Met Ser Thr Ile Asn Asn Tyr Lys Pro Val Phe Thr Phe Gly
245 250 255

Glu Trp Phe Leu Gly Val Asn Glu Ile Ser Pro Glu Tyr His Gln Phe
260 265 270

Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Ala Gln Lys
275 280 285

Ala Arg Gln Val Phe Arg Asp Asn Thr Asp Asn Met Tyr Gly Leu Lys
290 295 300

Ala Met Leu Glu Gly Ser Glu Val Asp Tyr Ala Gln Val Asn Asp Gln
305 310 315 320

Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Glu Arg Phe His Thr Ser Asn
325 330 335

Gly Asp Arg Arg Lys Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser
340 345 350

Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Tyr Met Ser Gly
355 360 365

Gly Asn Asp Pro Asp Asn Arg Ala Arg Ile Pro Ser Phe Ser Thr Thr
370 375 380

Thr Thr Ala Tyr Gln Val Ile Gln Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser
385 390 395 400

Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Glu Arg Trp Ile Asn Asn
405 410 415

Asp Val Ile Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Asn Asn Val Ala Val Val
420 425 430

Ala Ile Asn Arg Asn Met Asn Thr Pro Ala Ser Ile Thr Gly Leu Val
435 440 445

Thr Ser Leu Pro Gln Gly Ser Tyr Asn Asp Val Leu Gly Gly Ile Leu
450 455 460

Asn Gly Asn Thr Leu Thr Val Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ser Asn Phe
465 470 475 480

Thr Leu Ala Pro Gly Gly Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Thr Asp Ala
485 490 495

Thr Ala Pro Ile Ile Gly Asn Val Gly Pro Met Met Ala Lys Pro Gly
500 505 510

Val Thr Ile Thr Ile Asp Gly Arg Ala Ser Ala Arg Gln Gly Thr Val
515 520 525

Tyr Phe Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ala Asp Ile Val Ala Trp Glu
530 535 540

Asp Thr Gln Ile Gln Val Lys Ile Leu Arg Val Pro Gly Gly Ile Tyr
545 550 555 560

Asp Ile Arg Val Ala Asn Ala Ala Gly Ala Ala Ser Asn Ile Tyr Asp
565 570 575

Asn Phe Glu Val Leu Thr Gly Asp Gln Val Thr Val Arg Phe Val Ile
580 585 590

Asn Asn Ala Thr Thr Ala Leu Gly Gln Asn Val Phe Leu Thr Gly Asn
595 600 605

Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Asp Pro Asn Asn Ala Ile Gly Pro Met
610 615 620

Tyr Asn Gln Val Val Tyr Gln Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser
625 630 635 640

Val Pro Ala Gly Gln Thr Ile Glu Phe Lys Phe Leu Lys Lys Gln Gly
645 650 655

Ser Thr Val Thr Trp Glu Gly Gly Ala Asn Arg Thr Phe Thr Thr Pro
660 665 670

Thr Ser Gly Thr Ala Thr Val Asn Val Asn Trp Gln Pro
675 680 685

<210> 2
<211> 685
<212> PRT
<213> Bacillus sp. I-5
<400> 2

Ala Pro Asp Thr Ser Val Ser Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val
1 5 10 15

Ile Tyr Gln Ile Phe Thr Asp Arg Phe Ser Asp Gly Asn Pro Ala Asn

20 25 30
 Asn Pro Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Ser Cys Thr Asn Leu Arg Leu
 35 40 45

 Tyr Cys Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asn Lys Ile Asn Asp Gly
 50 55 60
 Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Ser Gln Pro Val
 65 70 75 80
 Glu Asn Ile Tyr Ser Val Ile Asn Tyr Ser Gly Val His Asn Thr Ala
 85 90 95
 Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Ala Tyr
 100 105 110
 Gly Thr Met Gln Asp Phe Lys Asn Leu Ile Asp Thr Ala His Ala His

 115 120 125
 Asn Ile Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala
 130 135 140
 Ser Ser Asp Asp Pro Ser Phe Ala Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn
 145 150 155 160
 Gly Asn Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Gln Asn Leu Phe His
 165 170 175
 His Tyr Gly Gly Thr Asp Phe Ser Thr Ile Glu Asn Gly Ile Tyr Lys
 180 185 190

 Asn Leu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Ser Val Asp
 195 200 205
 Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ile Lys Met Trp Leu Asp Leu Gly Val Asp
 210 215 220
 Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asn Glu Met Pro Phe Gly Trp Gln Lys
 225 230 235 240
 Ser Phe Met Ser Thr Ile Asn Asn Tyr Lys Pro Val Phe Thr Phe Gly
 245 250 255
 Glu Trp Phe Leu Gly Val Asn Glu Ile Ser Pro Glu Tyr His Gln Phe

 260 265 270

Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Ala Gln Lys
275 280 285

Ala Arg Gln Val Phe Arg Asp Asn Thr Asp Asn Met Tyr Gly Leu Lys
290 295 300

Ala Met Leu Glu Gly Ser Glu Val Asp Tyr Ala Gln Val Asn Asp Gln
305 310 315 320

Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Glu Arg Phe His Thr Ser Asn
325 330 335

Gly Asp Arg Arg Lys Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser
340 345 350

Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Tyr Met Ser Gly
355 360 365

Gly Asn Asp Pro Asp Asn Arg Ala Arg Ile Pro Ser Phe Ser Thr Thr
370 375 380

Thr Thr Ala Tyr Gln Val Ile Gln Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser
385 390 395 400

Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Glu Arg Trp Ile Asn Asn
405 410 415

Asp Val Ile Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Asn Asn Val Ala Val Val
420 425 430

Ala Ile Asn Arg Asn Met Asn Thr Pro Ala Ser Ile Thr Gly Leu Val
435 440 445

Thr Ser Leu Pro Gln Gly Ser Tyr Asn Asp Val Leu Gly Gly Ile Leu
450 455 460

Asn Gly Asn Thr Leu Thr Val Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ser Asn Phe
465 470 475 480

Thr Leu Ala Pro Gly Gly Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Thr Asp Ala
485 490 495

Thr Ala Pro Ile Ile Gly Asn Val Gly Pro Met Met Ala Lys Pro Gly
500 505 510

Val Thr Ile Thr Ile Asp Gly Arg Ala Ser Ala Arg Gln Gly Thr Val
515 520 525

Tyr Phe Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ala Asp Ile Val Ala Trp Glu
 530 535 540
 Asp Thr Gln Ile Gln Val Lys Ile Leu Arg Val Pro Gly Gly Ile Tyr

 545 550 555 560
 Asp Ile Arg Val Ala Asn Ala Ala Gly Ala Ala Ser Asn Ile Tyr Asp
 565 570 575
 Asn Phe Glu Val Leu Thr Gly Asp Gln Val Thr Val Arg Phe Val Ile
 580 585 590
 Asn Asn Ala Thr Thr Ala Leu Gly Gln Asn Val Phe Leu Thr Gly Asn
 595 600 605
 Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Asp Pro Asn Asn Ala Ile Gly Pro Met
 610 615 620

 Tyr Asn Gln Val Val Tyr Gln Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser
 625 630 635 640
 Val Pro Ala Gly Gln Thr Ile Glu Phe Lys Phe Leu Lys Lys Gln Gly
 645 650 655
 Ser Thr Val Thr Trp Glu Gly Gly Ala Asn Arg Thr Phe Thr Thr Pro
 660 665 670
 Thr Ser Gly Thr Ala Thr Val Asn Val Asn Trp Gln Pro
 675 680 685