

명세서

발명의 명칭: 알룰로스를 생산하는 스타필로코커스 속 미생물 및 이를 이용한 알룰로스 제조방법

기술분야

- [1] 본 출원은 알룰로스를 생산하는 미생물 및 이를 이용하여 알룰로스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] D-알룰로스는 과당(D-fructose)의 3번 탄소의 에피머로서, 자연계에 극소량 존재하는 희소당(rare sugar)으로 알려진 단당류이다. 설탕의 약 70% 감미도를 가지고 있으나 거의 제로 칼로리에 가깝고, 혈당 상승 억제 및 지방 합성 억제 등의 기능으로 기능성 식품에 사용될 수 있는 새로운 식품원료로서 많은 관심을 받고 있다.
- [4] 이러한 특징으로 알룰로스는 설탕 대체 감미료로 다양한 식품에 사용이 고려되고 있으나, 자연계에 극히 소량 존재하기 때문에 알룰로스를 효율적으로 제조할 수 있는 방법에 대한 필요성이 높아지고 있다.
- [5] 종래 알려진 알룰로스의 생산 방법은 폴리브텐산 이온의 촉매작용을 이용하거나, 에탄올과 트라이에틸아민(triethylamine)과 함께 가열하여 D-프럭토스에서 알룰로스를 생산하는 화학적 방법이 알려져 있었으나, 이러한 화학적 방법은 낮은 알룰로스 생성 수율, 높은 제조 비용 등의 단점이 있다.
- [6] 이와 같은 문제점을 해결하고자, 미생물 유래의 에피머화 효소를 이용하여 과당으로부터 알룰로스를 생산하는 생물학적 방법이 연구되고 있다. *Agrobacterium tumefaciens* 유래의 D-알룰로스 3-에피머화 유전자를 보유한 유전자재조합미생물을 이용하여 알룰로스를 생산하는 기술을 시작으로, 최근에는 자연환경 또는 식품에서 미생물 균주를 분리하여 이를 이용하여 D-프럭토스로부터 알룰로스를 생산하는 방법도 보고되었다(대한민국 특허공개 제10-2011-0035805호, 대한민국 특허공개 제10-1804778호, 대한민국 특허공개 제10-2017-0067070호, 대한민국 특허공개 제10-2016-00817220호). 그러나, 알룰로스를 생산하기 위한 생물학적 기술이 개발되고 있으나, 생축매로 이용되는 미생물의 낮은 열안정성이나 높은 생산단가로 인하여 알룰로스를 생산할 수 신규한 미생물 자원의 발굴이 절실히 필요하다.
- [7]
- [8] 이러한 배경하에, 알룰로스를 고온의 환경에서도 생산할 수 있는 미생물을 개발하고자 예의 연구한 결과, 스타필로코커스 속 미생물이 알룰로스를 생산할 수 있음을 확인하고 본 출원을 완성하였다.
- [9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 출원은 스타필로코커스 속 미생물을 포함하는 알룰로스 생산용 조성물을 제공한다.

[11] 본 출원은 상기 조성물을 이용하여 알룰로스를 제조하는 방법을 제공한다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[14]

[15] 본 출원의 하나의 양태는 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물, 또는 상기 스타필로코커스 속 미생물의 배양물을 포함하는 알룰로스 생산용 조성물을 제공할 수 있다.

[16]

[17] 구체적으로, 상기 스타필로코커스 속 미생물은 스타필로코커스 아그네티스(*Staphylococcus agnetis*), 스타필로코커스 아르젠시스(*Staphylococcus argensis*), 스타필로코커스 아르젠테우스(*Staphylococcus argenteus*), 스타필로코커스 알레테(*Staphylococcus arlettae*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스타필로코커스 캐피티스(*Staphylococcus capitis*), 스타필로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스타필로코커스 카르노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스타필로코커스 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스타필로코커스 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스타필로코커스 콘디멘트(*Staphylococcus condiment*), 스타필로코커스 코르누비엔시스(*Staphylococcus cornubiensis*), 스타필로코커스 델피니(*Staphylococcus delphini*), 스타필로코커스 데브리예세이(*Staphylococcus devriesei*), 스타필로코커스 에다피커스(*Staphylococcus edaphicus*), 스타필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스타필로코커스 이쿼룸(*Staphylococcus equorum*), 스타필로코커스 파에칼리스(*Staphylococcus faecalis*), 스타필로코커스 펠리스(*Staphylococcus felis*), 스타필로코커스 프레우레티(*Staphylococcus fleurettii*), 스타필로코커스 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스타필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스타필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 스타필로코커스 하이커스(*Staphylococcus hyicus*), 스타필로코커스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스타필로코커스 클루시(*Staphylococcus kloosii*), 스타필로코커스

리아이(*Staphylococcus leei*), 스태필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*), 스태필로코커스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*), 스태필로코커스 루트래(*Staphylococcus lutrae*), 스태필로코커스 리티칸스(*Staphylococcus lyticans*), 스태필로코커스 마시리엔시스(*Staphylococcus massiliensis*), 스태필로코커스 마이크로티(*Staphylococcus microti*), 스태필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스태필로코커스 네파렌시스(*Staphylococcus nepalensis*), 스태필로코커스 파스테우리(*Staphylococcus pasteurii*), 스태필로코커스 페트라시(*Staphylococcus petrasii*), 스태필로코커스 페텐코페리(*Staphylococcus pettenkoferi*), 스태필로코커스 피스키페르멘탄스(*Staphylococcus piscifermentans*), 스태필로코커스 슈딘테르메디우스(*Staphylococcus pseudintermedius*), 스태필로코커스 슈도루그두넨시스(*Staphylococcus pseudolugdunensis*), 스태필로코커스 로스트리(*Staphylococcus rostri*), 스태필로코커스 사카로리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*), 스태필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스태필로코커스 슈레이페리(*Staphylococcus schleiferi*), 스태필로코커스 슈바이제리(*Staphylococcus schweitzeri*), 스태필로코커스 스키후리(*Staphylococcus sciuri*), 스태필로코커스 시미애(*Staphylococcus simiae*), 스태필로코커스 시물란스(*Staphylococcus simulans*), 스태필로코커스 스테파노비치(*Staphylococcus stepanovicii*), 스태필로코커스 석시누스(*Staphylococcus succinus*), 스태필로코커스 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스태필로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 및 스태필로코커스 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [18] 보다 구체적으로, 상기 스태필로코커스 속 미생물은 스태필로코커스 카노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스태필로코커스 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*), 스태필로코커스 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스태필로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 스태필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스태필로코커스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스태필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스태필로코커스 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스태필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스태필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*), 스태필로코커스 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스태필로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스태필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스태필로코커스 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스태필로코커스 알레테(*Staphylococcus arlettae*), 스태필로코커스 이퀴룸(*Staphylococcus equorum*), 스태필로코커스 클루시(*Staphylococcus kloosii*), 스태필로코커스 델피니(*Staphylococcus delphini*),

및 스타필로코커스 파스테우리(*Staphylococcus pasteurii*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 보다 더 구체적으로는 스타필로코커스 카노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스타필로코커스 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*), 또는 스타필로코커스 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[19]

[20] 본 출원에서, D-알룰로스(D-allulose; 이하 알룰로스)는 D-과당의 에피머로서, 에피머화 효소에 의해 과당(프럭토스)으로부터 제조된다. 본 출원에서는 사이코스(psicose)와 혼용되어 사용될 수 있다.

[21]

[22] 본 출원에서, 기질로 이용되는 과당은 전환효소에 의해 분해된 설탕에서 얻어지거나 또는 액상과당으로부터 수득한 것일 수 있고, 또는 판매되는 것을 구입한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[23]

[24] 본 출원의 스타필로코커스 속 미생물은 D-프럭토스를 D-알룰로스로 전환하는 활성을 가진다. 상기 스타필로코커스 속 미생물은 보유하고 있는 대사 시스템을 이용하여 D-프럭토스로부터 D-알룰로스를 생산하는데, 이와 같은 전환 반응은 균체 내에서 수행될 수도 있고, 또는, 균체 외로 분비되어 수행될 수도 있으나, 과당으로부터 알룰로스를 생산할 수 있는 스타필로코커스 속 미생물인 한, 알룰로스 생산 과정의 제한 없이 본 출원의 범주에 속한다.

[25]

한편, 본 출원의 스타필로코커스 속 미생물은 야생형 미생물뿐만 아니라, 자연적 또는 비자연적으로 발생하는 변이를 포함하는 변이 미생물을 의미할 수도 있다. 구체적으로 비자연적으로 발생하는 변이는 야생형 미생물 또는 자연적 변이 미생물에 UV조사, 방사선(감마선, X선)을 조사하거나 화학적 변이제를 사용하여 변이시키는 것일 수 있다. 야생형 스타필로코커스 속 미생물과 다른 유전 형질을 갖더라도, 과당으로부터 알룰로스 생산능을 갖는 스타필로코커스 속 미생물의 특성을 갖는 한, 본 출원의 범주에 속한다.

[26]

또한, 본 출원의 스타필로코커스 속 미생물은 고온의 환경, 예를 들어, 50°C 이상의 온도에서도 알룰로스를 생산할 수 있는 내열성을 가지므로, 알룰로스 생산 수율을 높일 수 있는 장점을 갖는다.

[27]

[28] 본 출원의 스타필로코커스 속 미생물은 과당으로부터 알룰로스로 전환하는 활성을 나타내며, 산업적으로 활용 가능한 알룰로스 전환율을 나타내는 한, 본 출원의 범주에 속할 수 있다.

[29]

[30] 본 출원에서, 상기 전환율은 12시간 동안 반응하여 생성된 알룰로스 농도/초기 과당 농도(1 wt%)으로 표현될 수 있으며, 본 출원의 스타필로코커스 속 미생물은 0.1% 이상, 구체적으로 0.3% 이상, 0.5% 이상, 0.9% 이상, 1.6% 이상, 2.3% 이상,

3.4% 이상, 5.3% 이상, 10.4% 이상, 24.5% 이상의 전환율을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [31] 본 출원에서 전환율 측정은 당업계에 공지된 방법으로 측정될 수 있으며, 특정 방법에 제한되지 않는다. 일례로, 본 출원에서 전환율은 12시간 동안 pH7.5, 55°C에서 수행된 알룰로스로의 전환 반응 결과를 측정하였으나, 반응 조건(예를 들어, pH, 온도, 시간 등)은 당업자가 적절히 선택하여 전환율을 측정할 수 있다.

[32]

- [33] 특히, 상기 스태필로코커스 속 미생물은 병원성을 갖지 않는 것으로 알려져 있어, 다양한 식품에 활용될 수 있는 장점을 갖는다.

- [34] 이에, 본 출원의 스태필로코커스 속 미생물은 비병원성일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 비병원성 미생물로 알려진 스태필로코커스 속 미생물은 스태필로코커스 아르젠시스(*Staphylococcus argensis*), 스태필로코커스 캐피티스(*Staphylococcus capitis*), 스태필로코커스 데브리예세이(*Staphylococcus devriesei*), 스태필로코커스 파에칼리스(*Staphylococcus faecalis*), 스태필로코커스 스키후리(*Staphylococcus sciuri*), , 스태필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 스태필로코커스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*), 스태필로코커스 미크로티(*Staphylococcus microti*), 스태필로코커스 피스키페르멘탄스(*Staphylococcus piscifermentans*), 스태필로코커스 슈바이제리(*Staphylococcus schweitzeri*), 스태필로코커스 시뮬란스(*Staphylococcus simulans*), 스태필로코커스 식시누스(*Staphylococcus succinus*), 스태필로코커스 알레타(*Staphylococcus arlettae*), 스태필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스태필로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스태필로코커스 카르노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스태필로코커스 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스태필로코커스 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스태필로코커스 델피니(*Staphylococcus delphini*), 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스태필로코커스 이쿼룸(*Staphylococcus equorum*), 스태필로코커스 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스태필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스태필로코커스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스태필로코커스 클루시(*Staphylococcus kloosii*), 스태필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*), 스태필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스태필로코커스 파스테우리(*Staphylococcus pasteurii*), 스태필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스태필로코커스 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스태필로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 또는 스태필로코커스 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [35] 본 출원에서, 비병원성 미생물은 사람을 비롯한 개체에서 병해 증상을

가져오지 않는 미생물을 의미하며, 국제적으로 통용되는 생물학적 안전수준(Biosafety level) 1등급에 해당하는 안전한 균주를 의미한다. 구체적으로는 스태필로코커스 속 미생물 중 생물학적 안전수준(Biosafety level) 2등급 이상에 해당하는 스태필로코커스 아그네티스(*Staphylococcus agnetis*), 스태필로코커스 아르젠테우스(*Staphylococcus argenteus*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스태필로코커스 코르누비엔시스(*Staphylococcus cornubiensis*), 스태필로코커스 펠리스(*Staphylococcus felis*), 스태필로코커스 프레우레티(*Staphylococcus fleurettii*), 스태필로코커스 하이커스(*Staphylococcus hyicus*), 스태필로코커스 루트래(*Staphylococcus lutrae*), 스태필로코커스 마시리엔시스(*Staphylococcus massiliensis*), 스태필로코커스 네파렌시스(*Staphylococcus nepalensis*), 스태필로코커스 페트라시(*Staphylococcus petrasii*), 스태필로코커스 페텐코페리(*Staphylococcus pettenkoferi*), 스태필로코커스 슈딘테르메디우스(*Staphylococcus pseudintermedius*), 스태필로코커스 로스트리(*Staphylococcus rostri*), 스태필로코커스 슈레이페리(*Staphylococcus schleiferi*) 스태필로코커스 시미애(*Staphylococcus simiae*), 스태필로코커스 스테파노비치(*Staphylococcus stepanovicii*) 균주를 제외한 모든 균주를 의미한다.

- [36] 본 출원의 비병원성 스태필로코커스 속 미생물은 알룰로스 생산능을 가지면서도 인간을 비롯한 개체에 유해한 영향을 미치지 않는 것을 특징으로 한다.
- [37]
- [38] 본 출원에서는 상기 스태필로코커스 속에 속하는 다양한 미생물, 특히 비병원성 미생물이 과당을 알룰로스로 전환하는 활성을 가지는 것을 확인하였을 뿐만 아니라, 상기 미생물의 16S rRNA를 분석하여 유전적 근연성을 가지는 것을 확인하였다.
- [39] 본 출원에서, “16S rRNA”는 16S 리보솜 RNA(16S ribosomal RNA)를 의미하며, 원핵생물 리보솜의 30S 소단위체를 구성하는 rRNA로, 1,500 뉴클레오타이드 정도의 길이를 갖는다. 상기 16S rRNA 서열은 대부분 상당히 보존되어 있는 한편 일부 구간에서는 높은 염기서열 다양성이 나타나고, 특히 동종간에는 다양성이 거의 없는 반면에 타종간에는 다양성이 나타나므로, 원핵생물을 동정하는데 일반적으로 이용되는 서열로 알려져 있다. 즉, 16S rRNA 서열의 상동성을 비교함으로써 유전적 근연성을 판단할 수 있으며 16S rRNA 서열의 상동성(유사성)이 높을수록 유사한 유전적 형질을 갖는 것으로 이해될 수 있다. 본 출원에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.
- [40] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [41] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오타이드 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭

페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한 (identical) 서열은 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상으로 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

[42] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ET AL.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, Clustal omega 프로그램(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>), 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

[43] 폴리뉴클레오티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스 (또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티 (또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 출원에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)을 나타낸다.

[44]

[45] 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 1종, 2종, 또는 그 이상의 스태필로코커스 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [46]
- [47] 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 과당을 알룰로스로 전환하는 활성을 갖는 스타필로코커스 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함함으로써 알룰로스를 생산할 수 있다.
- [48] 본 출원에서, "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미하며, "배양물"은 미생물을 배양시켜 수득한 산물을 의미하여, 미생물, 또는 상기 미생물로부터 분비된 물질을 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [49] 본 출원에서 스타필로코커스 속 미생물을 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 배양은 배치 공정, 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정에서 회분식, 연속식 또는 유가식으로 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [50] 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 하며, 스타필로코커스 속 미생물의 배양을 위한 배지 조건은 공지되어 있다.
- [51] 구체적으로, 배지 중에서 사용될 수 있는 당원으로는 포도당, 사카로즈, 유당, 과당, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52] 사용될 수 있는 탄소원으로는 원당 또는 포도당일 수 있고, 원당을 다량으로 포함한 당밀일 수 있으며, 구체적으로 정제 포도당일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 이외의 탄소원이 다양하게 이용될 수 있다.
- [53] 사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [54] 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨을 함유하는 염이 포함될 수 있다.
- [55] 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함할 수 있다. 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.
- [56] 또한, 상기 미생물의 배양 중 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해

배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입할 수 있다.

[57]

[58] 한편, 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 상기 스태필로코커스 속 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물 외에 기질인 과당, 및/또는 알룰로스 생산에 관여하는 효소를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[59]

[60] 또한, 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 당해 알룰로스 생산용 조성물에 통상 사용되는 임의의 적합한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 부형제에는, 예를 들어, 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 및 등장화제 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[61]

본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 금속 이온 또는 금속염을 추가로 포함할 수 있다. 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 상기 금속 이온 또는 금속염을 조성물 내에 포함하여 과당에서 알룰로스로 전환할 수 있는 활성을 가질 수 있고, 상기 금속 이온 또는 금속염은 스태필로코커스 속 미생물이 과당으로부터 알룰로스를 생산하는 과정에서 요구되는 것일 수 있으며, 예를 들어, 상기 전환 과정을 매개하는 효소의 작용에 의해 요구되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물에 포함되는 금속 이온 또는 금속염은 상기 조성물이 과당을 알룰로스로 전환하는 활성을 나타낼 수 있는 한, 당업자가 알려진 금속 이온 또는 금속염을 적절히 선택할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 금속 이온은 2가 양이온일 수 있으며, 구체적으로 Ni, Mg, Ni, Co, Mn, Fe 및 Zn으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 금속 이온일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 금속염을 추가로 포함할 수 있으며, 보다 더 구체적으로 상기 금속염은 NiSO₄, MgSO₄, MgCl₂, NiCl₂, CoSO₄, CoCl₂, MnCl₂, MnSO₄, FeSO₄ 및 ZnSO₄로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[62]

[63] 본 출원의 다른 하나의 양태는 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물 또는 상기 스태필로코커스 속 미생물의 배양물의 알룰로스 생산 용도를 제공할 수 있다.

[64]

상기 “스태필로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물” 및 “스태필로코커스 속 미생물의 배양물”은 앞서 설명한 바와 같다.

[65]

[66] 본 출원의 다른 양태는 상기 조성물, 및 과당을 접촉시켜 과당을 알룰로스로 전환하는 단계를 포함하는, 알룰로스 제조방법을 제공한다.

[67]

구체적으로, 상기 스태필로코커스 속 미생물은 스태필로코커스 아그네티스(*Staphylococcus agnetis*), 스태필로코커스 아르젠시스(*Staphylococcus argensis*), 스태필로코커스 아르젠테우스(*Staphylococcus argenteus*), 스태필로코커스 알레테(*Staphylococcus arlettae*), 스태필로코커스

아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스
 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스타필로코커스
 캐피티스(*Staphylococcus capitis*), 스타필로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스타필로코커스 카르노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스타필로코커스
 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스타필로코커스 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스타필로코커스 콘디멘트(*Staphylococcus condiment*), 스타필로코커스
 코르누비엔시스(*Staphylococcus cornubiensis*), 스타필로코커스
 델피니(*Staphylococcus delphini*), 스타필로코커스 데브리예세이(*Staphylococcus devriesei*), 스타필로코커스 에다피커스(*Staphylococcus edaphicus*),
 스타필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스타필로코커스
 이쿼럼(*Staphylococcus equorum*), 스타필로코커스 파에칼리스(*Staphylococcus faecalis*), 스타필로코커스 펠리스(*Staphylococcus felis*), 스타필로코커스
 프레우레티(*Staphylococcus fleurettii*), 스타필로코커스 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스타필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*),
 스타필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 스타필로코커스
 하이커스(*Staphylococcus hyicus*), 스타필로코커스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스타필로코커스 클루시(*Staphylococcus kloosii*), 스타필로코커스
 리아이(*Staphylococcus leei*), 스타필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*),
 스타필로코커스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*), 스타필로코커스
 루트래(*Staphylococcus lutrae*), 스타필로코커스 리티칸스(*Staphylococcus lyticans*),
 스타필로코커스 마시리엔시스(*Staphylococcus massiliensis*), 스타필로코커스
 마이크로티(*Staphylococcus microti*), 스타필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스타필로코커스 네파렌시스(*Staphylococcus nepalensis*), 스타필로코커스
 파스테우리(*Staphylococcus pasteurii*), 스타필로코커스 페트라시(*Staphylococcus petrasii*), 스타필로코커스 페텐코페리(*Staphylococcus pettenkoferi*),
 스타필로코커스 피스키페르멘탄스(*Staphylococcus piscifermentans*),
 스타필로코커스 슈딘테르메디우스(*Staphylococcus pseudintermedius*),
 스타필로코커스 슈도루그두넨시스(*Staphylococcus pseudolugdunensis*),
 스타필로코커스 로스트리(*Staphylococcus rostri*), 스타필로코커스
 사카로리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*), 스타필로코커스
 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스타필로코커스
 슈레이페리(*Staphylococcus schleiferi*), 스타필로코커스
 슈바이제리(*Staphylococcus schweitzeri*), 스타필로코커스
 스키후리(*Staphylococcus sciuri*), 스타필로코커스 시미애(*Staphylococcus simiae*),
 스타필로코커스 시물란스(*Staphylococcus simulans*), 스타필로코커스
 스테파노비치(*Staphylococcus stepanovicii*), 스타필로코커스
 석시누스(*Staphylococcus succinus*), 스타필로코커스 비톨리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스타필로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 및 스타필로코커스

자일로서스(*Staphylococcus xylosus*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [68] 보다 구체적으로, 상기 스태필로코커스 속 미생물은 스태필로코커스 카노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스태필로코커스 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*), 스태필로코커스 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스태필로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 스태필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스태필로코커스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스태필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스태필로코커스 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스태필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스태필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*), 스태필로코커스 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스태필로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스태필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스태필로코커스 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스태필로코커스 알레테(*Staphylococcus arlettae*), 스태필로코커스 이쿼럼(*Staphylococcus equorum*), 스태필로코커스 클루시(*Staphylococcus kloosii*), 스태필로코커스 델피니(*Staphylococcus delphini*), 및 스태필로코커스 파스테우리(*Staphylococcus pasteurii*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 보다 더 구체적으로는 스태필로코커스 카노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스태필로코커스 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*), 또는 스태필로코커스 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [69]
- [70] 본 출원의 제조방법은 설탕, 포도당으로부터 과당을 얻는 단계를 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 설탕, 포도당으로부터 과당을 얻기 위한 방법, 특히 효소를 이용한 생산 방법은 당업계에서 공지되어 있다.

[71]

- [72] 본 출원의 제조방법은 고온의 환경에서도 과당을 알룰로스로 전환할 수 있으므로, 오염원이 적고, 수율을 높일 수 있는 장점을 갖는다.

- [73] 구체적으로, 과당을 알룰로스로 전환하는 단계의 온도는 40°C 내지 70°C, 구체적으로 50°C 내지 70°C일 수 있고, 또한, 배양 시간은 원하는 알룰로스 생성량이 얻어질 때까지 계속될 수 있으나, 구체적으로는 5 내지 120시간, 보다 구체적으로, 10 내지 30시간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 출원의 제조방법에 있어서, 과당의 알룰로스로의 전환은 pH 5.0 내지 9.0, 구체적으로 pH 6.0 내지 8.0에서 실시할 수 있다.

[74]

- [75] 본 출원의 제조방법은 스태필로코커스 속 미생물에 의해 전환된 알룰로스를 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [76] 구체적으로, 알룰로스를 스테필로코커스 속 미생물을 파쇄하여 회수할 수 있고, 또는 스테필로코커스 속 미생물의 배양물로부터 알룰로스를 분리하는 것일 수 있으나, 스테필로코커스 속 미생물에 의해 전환된 알룰로스를 회수할 수 있다면 특정 방법에 제한되지 않는다.
- [77] 알룰로스의 분리는 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의하여 분리될 수 있다. 이러한 분리방법에는, 원심분리, 여과, 이온교환 크로마토그래피 및 결정화 등의 방법이 이용될 수 있다. 예를 들면, 배양물을 저속 원심분리하여 바이오매스를 제거하고 얻어진 상등액을, 이온교환 크로마토그래피를 통하여 분리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [78]
- [79] 또한, 본 출원의 제조방법은 알룰로스를 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 정제는 통상적으로 사용하는 방법을 사용할 수 있으며, 비제한적인 예로, 투석, 침전, 흡착, 전기영동, 이온교환 크로마토그래피 및 분별 결정 등을 사용할 수 있다. 상기 정제는 하나의 방법만 실시될 수도 있으며, 두 가지 이상의 방법을 함께 실시할 수도 있다. 예를 들어, 크로마토그래피를 통해 알룰로스 생성 반응물을 정제할 수 있으며, 상기 크로마토그래피에 의한 당의 분리는 분리하고자 하는 당과 이온 수지에 부착된 금속 이온 사이의 약한 결합력의 차이를 이용하여 수행될 수 있다.
- [80] 또한, 본 출원은 본 출원의 정제하는 단계의 전 또는 후에 탈색, 탈염 또는 둘 다를 실시하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 탈색 및/또는 탈염을 실시함으로써, 불순물 없이 보다 정제된 알룰로스 반응물을 얻을 수 있다.

[81]

발명의 효과

- [82] 본 출원의 스테필로코커스 속 미생물은 고온의 환경에서도 알룰로스를 생산할 수 있는 효과를 갖는다.

[83]

도면의 간단한 설명

- [84] 도 1은 스테필로코커스 텔피니 KCTC3592의 알룰로스 생성을 확인한 도이다.
- [85] 도 2는 비병원성 스테필로코커스 균주의 계통수를 나타낸 도이다.
- [86] 도 3은 비병원성 스테필로코커스 20종 균주의 계통수를 나타낸 도이다.

[87]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [88] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[89]

- [90] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 출원은 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물, 또는 상기 스타필로코커스 속 미생물의 배양물을 포함하는 알룰로스 생산용 조성물을 제공한다.
- [91] **발명의 실시를 위한 형태**
- [92] 이하 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [93]
- [94] **실시예 1: 스타필로코커스 속 미생물에 의한 알룰로스 생산 확인**
- [95]
- [96] 스타필로코커스 속 미생물의 알룰로스 생산능을 확인하기 위해, 스타필로코커스 속 비병원성 스타필로코커스 속 미생물 32종을 선택하였으며, 이중 스타필로코커스 속 미생물 20종에 대해 D-프럭토스로부터 알룰로스를 생산하는지 여부를 확인하였다.
- [97]
- [98] 구체적으로, 스타필로코커스 카노서스 2종 (KCTC3580, KACC13250), 스타필로코커스 자일로서스 2종(KCTC3342, KACC16180), 스타필로코커스 비툴리너스 3종 (KACC15803, KACC15804, KACC15805, KACC13211), 스타필로코커스 텔피니 (KCTC3592), 스타필로코커스 이쿼럼 (KCTC3589), 스타필로코커스 에피데미디스 (KCTC1917), 스타필로코커스 코니 (KCTC3574), 스타필로코커스 크로모제네스 (KCTC3579), 스타필로코커스 카프라에 (KCTC3583), 스타필로코커스 와르네리 (KCTC3340), 스타필로코커스 렌투스 (KCTC3577), 스타필로코커스 무스카에 (KCTC3576), 스타필로코커스 사프로피티쿠스 (KCTC3345), 스타필로코커스 파스테리 (KCTC13167), 스타필로코커스 인터메디우스 (KCTC3344), 스타필로코커스 알레테 (KCTC3588), 스타필로코커스 클루오시 (KCTC3590), 스타필로코커스 헤몰리티쿠스 (KCTC3341), 스타필로코커스 갈리나룸 (KCTC3585), 스타필로코커스 아우리쿨라리스 (KCTC3584)를 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KTCT)와 국립농업과학원(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)으로부터 분양 받았다.
- [99]
- [100] 상기 미생물을 각각 1% 알룰로스가 첨가된 Tryptic soy broth(Pepton 17g/L, Soytone 3g/L, Psicose 10g/L, NaCl 5g/L, K₂HPO₄ 2.5g/L, agar 15g/L)에 접종하여 30 또는 37°C에서 18시간 배양하였다. 이후, 배양된 균체를 회수하여 0.85 % (w/v) NaCl로 세척한 후 이를 이용하여 전세포 전환 반응을 수행하였다.
- [101] 균체 농도 20 % (w/w)에 1 % (w/w) D-프럭토스를 첨가한 50 mM potassium

phosphate 완충액(pH 7.5)를 넣어 부유시키고 55°C에서 12시간 동안 전환반응을 수행하였다.

[102]

[103] 상기 전환 반응 결과물의 상등액을 HPLC 분석을 통하여 알룰로스 생산을 확인하였다. HPLC 분석은 Aminex HPX-87C 컬럼(BIO-RAD)이 장착된 HPLC(Agilent, USA)의 Refractive Index Detector(Agilent 1260 RID)를 이용하였으며, 이동상 용매는 물을 사용하고 온도는 80°C, 유속은 0.6 ml/min으로 수행하였다. 알룰로스 전환율은 반응 전 기질(D-프럭토스)의 중량 대비 반응 후 생성된 알룰로스의 중량의 비(알룰로스 농도(12h 반응)/초기 과당 농도(1 wt%))로 계산하였다.

[104]

[105] 그 결과, 상기 20종의 스타필로코커스 속 미생물이 모두 D-프럭토스에서 알룰로스를 생산하는 것을 확인하였다 (표 1 및 도 1).

[106]

[107] [표1]

균주명	전환율(%)
스태필로코커스 델피니 KCTC3592	29.8
스태필로코커스 카노서스 KCTC3580	26.2
스태필로코커스 카노서스 KACC13250	25.7
스태필로코커스 이퀴럼 KCTC3589	24.5
스태필로코커스 에피더미디스 KCTC1917	15.8
스태필로코커스 코니 KCTC3574	10.4
스태필로코커스 자일로서스 KCTC3342	8.0
스태필로코커스 자일로서스 KACC16180	8.0
스태필로코커스 크로모제네스 KCTC3579	7.8
스태필로코커스 카프라에 KCTC3583	5.3
스태필로코커스 비톨리너스 KACC15803	3.3
스태필로코커스 비톨리너스 KACC15804	3.4
스태필로코커스 와르네리 KCTC3340	2.7
스태필로코커스 렌투스 KCTC3577	2.9
스태필로코커스 비톨리너스 KACC15805	2.6
스태필로코커스 무스카에 KCTC3576	2.3
스태필로코커스 파스테리 KCTC13167	1.8
스태필로코커스 인터메디우스 KCTC3344	1.7
스태필로코커스 사프로피티쿠스 KCTC3345	1.6
스태필로코커스 알레테 KCTC3588	1.2
스태필로코커스 비톨리너스 KACC13211	0.9
스태필로코커스 클루오시 KCTC3590	0.8
스태필로코커스 헤몰리티쿠스 KCTC3341	0.5
스태필로코커스 갈리나룸 KCTC3585	0.4
스태필로코커스 아우리쿨라리스 KCTC3584	0.3

[108]

[109] **실시예 2: 스타필로코커스 속 미생물의 16S rRNA 유사성 확인**

[110]

[111] 실시예 2-1. 비병원성 스타필로코커스 미생물의 16S rRNA 유사성 확인

[112] 본 실시예에서 비병원성 (생물안전성 1등급) 스타필로코커스 속 미생물로 분류한 미생물은 다음과 같다: *Staphylococcus argensis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus devriesei*, *Staphylococcus faecalis*, *Staphylococcus sciuri*, ,

Staphylococcus hominis, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus microti*, *Staphylococcus piscifermentans*, , *Staphylococcus schweitzeri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus succinus*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus muscae*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus vitulinus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus*.

- [113] 상기 비병원성 스타필로코커스 속 미생물 중 16s rRNA 서열이 확인되지 않은 스타필로코커스 패칼리스 1종을 제외한 31종의 16s rRNA서열을 기반으로 Clustal omega 프로그램(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)을 사용하여 균주 간 서열상의 상동성을 분석하였다. 각 균주의 대표 16s rRNA서열은 NCBI database에서 확인하였다.
- [114] 그 결과, 비병원성으로 알려진 스타필로코커스 속 미생물의 16s rRNA서열의 균주 간 상동성이 전부 92.78% 이상인 것을 확인하였다(도 2). 31종의 스타필로코커스 속 미생물은 대다수 95% 이상의 상동성을 나타내었으며, *Staphylococcus argensis*의 경우 92.78%~95.21%의 상동성을 나타내었다.
- [115]
- [116] 이는, 비병원성으로 분류된 스타필로코커스 미생물 31종 모두 높은 유전적 근연성을 나타냄을 뒷받침하는 결과이다.
- [117]
- [118] 실시예 2-2. 비병원성 스타필로코커스 미생물 20종의 16S rRNA 유사성 확인
- [119] 상기 실시예 1에서 알룰로스 전환능이 확인된 20종의 스타필로코커스 속 미생물의 16s rRNA서열을 기반으로 Clustal omega 프로그램(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)을 사용하여 서열상의 상동성을 분석하였다. 각 균주의 대표 16s rRNA서열은 NCBI database에서 확인하였다.
- [120] 그 결과, 알룰로스 생산능이 확인된 스타필로코커스 속 미생물 20종의 16s rRNA서열 상동성이 95.97% 이상인 것을 확인하였다.
- [121]
- [122] 상기 실시예로부터, 비병원성 스타필로코커스 속 미생물은 모두 종 간 높은 유전적 근연성을 갖는 한편, 이와 같은 높은 유전적 근연성을 갖는 스타필로코커스 속 미생물들이 프리토스에서 알룰로스를 생산하는 활성을 갖는 것을 확인하였다.
- [123]
- [124] 이상의 설명으로부터, 본원이 속하는 기술분야의 당업자는 본원이 그 기술적

사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[125]

[126]

청구범위

- [청구항 1] 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물, 또는 상기 스타필로코커스 속 미생물의 배양물을 포함하는 알룰로스 생산용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 스타필로코커스 속 미생물은 스타필로코커스 아그네티스(*Staphylococcus agnetis*), 스타필로코커스 아르젠시스(*Staphylococcus argensis*), 스타필로코커스 아르젠테우스(*Staphylococcus argenteus*), 스타필로코커스 알레테(*Staphylococcus arlettae*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스타필로코커스 캐피티스(*Staphylococcus capitis*), 스타필로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스타필로코커스 카르노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스타필로코커스 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스타필로코커스 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스타필로코커스 콘디멘트(*Staphylococcus condiment*), 스타필로코커스 코르누비엔시스(*Staphylococcus cornubiensis*), 스타필로코커스 델피니(*Staphylococcus delphini*), 스타필로코커스 데브리예세이(*Staphylococcus devriesei*), 스타필로코커스 에다피커스(*Staphylococcus edaphicus*), 스타필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스타필로코커스 이쿼럼(*Staphylococcus equorum*), 스타필로코커스 파에칼리스(*Staphylococcus faecalis*), 스타필로코커스 펠리스(*Staphylococcus felis*), 스타필로코커스 프레우레티(*Staphylococcus fleurettii*), 스타필로코커스 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스타필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스타필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 스타필로코커스 하이커스(*Staphylococcus hyicus*), 스타필로코커스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스타필로코커스 클루시(*Staphylococcus kloosii*), 스타필로코커스 리아이(*Staphylococcus leei*), 스타필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*), 스타필로코커스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*), 스타필로코커스 루트래(*Staphylococcus lutrae*), 스타필로코커스 리티칸스(*Staphylococcus lyticans*), 스타필로코커스 마시리엔시스(*Staphylococcus massiliensis*), 스타필로코커스 마이크로티(*Staphylococcus microti*), 스타필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스타필로코커스 네파렌시스(*Staphylococcus nepalensis*), 스타필로코커스 파스테우리(*Staphylococcus pasteurii*), 스타필로코커스

페트라시(*Staphylococcus petrasii*), 스타필로코커스
 페텐코페리(*Staphylococcus pettenkoferi*), 스타필로코커스
 피스키페르멘탄스(*Staphylococcus piscifermentans*), 스타필로코커스
 슈딘테르메디우스(*Staphylococcus pseudintermedius*), 스타필로코커스
 슈도루그두넨시스(*Staphylococcus pseudolugdunensis*), 스타필로코커스
 로스트리(*Staphylococcus rostri*), 스타필로코커스
 사카로리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*), 스타필로코커스
 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스타필로코커스
 슈레이페리(*Staphylococcus schleiferi*), 스타필로코커스
 슈바이제리(*Staphylococcus schweitzeri*), 스타필로코커스
 스키후리(*Staphylococcus sciuri*), 스타필로코커스 시미애(*Staphylococcus simiae*), 스타필로코커스 시물란스(*Staphylococcus simulans*),
 스타필로코커스 스테파노비치(*Staphylococcus stepanovicii*),
 스타필로코커스 석시누스(*Staphylococcus succinus*), 스타필로코커스
 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스타필로코커스
 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 및 스타필로코커스
 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느
 하나인 것인, 조성물.

- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 스타필로코커스 속 미생물은 스타필로코커스
 카노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스타필로코커스
 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*), 스타필로코커스
 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스타필로코커스
 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스타필로코커스
 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 스타필로코커스
 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스타필로코커스
 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스타필로코커스
 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스타필로코커스
 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스타필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스타필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*), 스타필로코커스
 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스타필로코커스
 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스타필로코커스
 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스타필로코커스
 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스타필로코커스
 알레테(*Staphylococcus arlettae*), 스타필로코커스 이쿼럼(*Staphylococcus equorum*), 스타필로코커스 클루오시(*Staphylococcus kloosii*),
 스타필로코커스 델피니(*Staphylococcus delphini*), 및 스타필로코커스
 파스테리(*Staphylococcus pasteurii*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느
 하나인 것인, 조성물.

- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 스타필로코커스 속 미생물은 비병원성인 것인, 조성물.
- [청구항 5] 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물, 또는 상기 스타필로코커스 속 미생물의 배양물 및 과당을 접촉시켜 과당을 알룰로스로 전환하는 단계를 포함하는, 알룰로스 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 스타필로코커스 속 미생물은 스타필로코커스 아그네티스(*Staphylococcus agnetis*), 스타필로코커스 아르젠시스(*Staphylococcus argensis*), 스타필로코커스 아르젠테우스(*Staphylococcus argenteus*), 스타필로코커스 알레테(*Staphylococcus arlettae*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스타필로코커스 캐피티스(*Staphylococcus capitis*), 스타필로코커스 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스타필로코커스 카르노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스타필로코커스 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스타필로코커스 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스타필로코커스 콘디멘트(*Staphylococcus condiment*), 스타필로코커스 코르누비엔시스(*Staphylococcus cornubiensis*), 스타필로코커스 델피니(*Staphylococcus delphini*), 스타필로코커스 테브리에세이(*Staphylococcus devriesei*), 스타필로코커스 에다피커스(*Staphylococcus edaphicus*), 스타필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스타필로코커스 이퀴럼(*Staphylococcus equorum*), 스타필로코커스 파에칼리스(*Staphylococcus faecalis*), 스타필로코커스 펠리스(*Staphylococcus felis*), 스타필로코커스 프레우레티(*Staphylococcus fleurettii*), 스타필로코커스 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스타필로코커스 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스타필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 스타필로코커스 하이커스(*Staphylococcus hyicus*), 스타필로코커스 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스타필로코커스 클루시(*Staphylococcus kloosii*), 스타필로코커스 리아이(*Staphylococcus leei*), 스타필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*), 스타필로코커스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*), 스타필로코커스 루트래(*Staphylococcus lutrae*), 스타필로코커스 리티칸스(*Staphylococcus lyticans*), 스타필로코커스 마시리엔시스(*Staphylococcus massiliensis*), 스타필로코커스 마이크로티(*Staphylococcus microti*), 스타필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스타필로코커스 네파렌시스(*Staphylococcus nepalensis*), 스타필로코커스

파스테우리(*Staphylococcus pasteurii*), 스태필로코커스
 페트라시(*Staphylococcus petrasii*), 스태필로코커스
 페텐코페리(*Staphylococcus pettenkoferi*), 스태필로코커스
 피스키페르멘탄스(*Staphylococcus piscifermentans*), 스태필로코커스
 슈던테르메디우스(*Staphylococcus pseudintermedius*), 스태필로코커스
 슈도루그두넨시스(*Staphylococcus pseudolugdunensis*), 스태필로코커스
 로스트리(*Staphylococcus rostri*), 스태필로코커스
 사카로리티쿠스(*Staphylococcus saccharolyticus*), 스태필로코커스
 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스태필로코커스
 슈레이페리(*Staphylococcus schleiferi*), 스태필로코커스
 슈바이제리(*Staphylococcus schweitzeri*), 스태필로코커스
 스키후리(*Staphylococcus sciuri*), 스태필로코커스 시미애(*Staphylococcus simiae*), 스태필로코커스 시플란스(*Staphylococcus simulans*),
 스태필로코커스 스테파노비치(*Staphylococcus stepanovicii*),
 스태필로코커스 석시누스(*Staphylococcus succinus*), 스태필로코커스
 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스태필로코커스
 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 및 스태필로코커스
 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느
 하나인 것인, 제조방법.

[청구항 7]

제5항에 있어서, 상기 스태필로코커스 속 미생물은 스태필로코커스
 카노서스(*Staphylococcus carnosus*), 스태필로코커스
 자일로서스(*Staphylococcus xylosus*), 스태필로코커스
 비툴리너스(*Staphylococcus vitulinus*), 스태필로코커스
 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스태필로코커스
 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 스태필로코커스
 헤몰리티쿠스(*Staphylococcus haemolyticus*), 스태필로코커스
 인터메디우스(*Staphylococcus intermedius*), 스태필로코커스
 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 스태필로코커스
 코니(*Staphylococcus cohnii*), 스태필로코커스 무스카에(*Staphylococcus muscae*), 스태필로코커스 렌투스(*Staphylococcus lentus*), 스태필로코커스
 크로모제네스(*Staphylococcus chromogenes*), 스태필로코커스
 카프라에(*Staphylococcus caprae*), 스태필로코커스
 아우리쿨라리스(*Staphylococcus auricularis*), 스태필로코커스
 갈리나룸(*Staphylococcus gallinarum*), 스태필로코커스
 알레테(*Staphylococcus arlettae*), 스태필로코커스 이쿼럼(*Staphylococcus equorum*), 스태필로코커스 클루시(*Staphylococcus kloosii*),
 스태필로코커스 델피니(*Staphylococcus delphini*), 및 스태필로코커스
 파스테우리(*Staphylococcus pasteurii*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느

- 하나인 것인, 제조방법.
- [청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 제조방법은 전환된 알룰로스를 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 제조방법.
- [청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 과당을 알룰로스로 전환하는 단계는 40°C 내지 70°C 온도에서 수행되는 것인, 제조방법.
- [청구항 10] 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물 또는 상기 스타필로코커스 속 미생물의 배양물의 알룰로스 생산 용도.