

명세서

발명의 명칭: 신규 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소, 이를 포함하는 싸이코스 생산용 조성물, 및 이를 이용한 싸이코스 제조방법

기술분야

- [1] 본 출원은 싸이코스를 제조하기 위해 싸이코스-6-인산을 탈인산화 하는 신규 효소, 이를 포함하는 싸이코스 생산용 조성물, 및 이를 이용하여 싸이코스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 싸이코스-3-에피머화효소(D-psicose-3-epimerase, EC 5.1.3.30) 및 타가토스-3-에피머화효소(D-tagatose-3-epimerase, EC 5.1.3.31)는 과당(D-fructose)을 3-에피머화(3-epimerization, 3번 탄소 에피머화)하여 싸이코스(D-psicose)를 생산할 수 있는 효소로 알려져 있다. 상기 효소를 이용하는 단일 효소반응으로 싸이코스를 생산하는 경우, 기질인 과당과 산물인 싸이코스 간에 일정 수준의 반응평형(reaction equilibrium)이 존재한다 (산물/기질 = 약 20% 내지 35%). 따라서, 고순도의 싸이코스를 제조하기 위해서는 효소 반응 결과물로부터 비교적 고농도의 과당을 분리하여 제거해야 하는 추가 정제공정이 요구되는 문제점이 있다. 또한 과당은 전분이나 포도당에 비하여 비교적 고비용 원료로 과당을 원료로 생산시 싸이코스과 타가토스의 원가 비율이 높아지게 된다. 이에 비교적 경제적인 전분 또는 포도당을 이용한 반응을 통하여 알룰로스 및 타가토스 생산의 다양한 연구가 발표 되고 있다. (KR 10-2018-0004023, WO2018-112139, WO2017-059278, WO2018-129275).
- [4] 한편, Chan 등(2008. Biochemistry. 47:9608-9617)은 과당-6-인산(D-fructose-6-phosphate) 및 싸이코스-6-인산(D-psicose-6-phosphate)에 대해서 3-에피머화 반응을 수행할 수 있는 스트렙토코커스 파이로제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 리불로스-5-인산-3-에피머화효소(D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase, EC 5.1.3.1) 및 *E. coli* 유래의 싸이코스-6-인산-3-에피머화효소(D-psicose 6-phosphate-3-epimerase, EC 5.1.3.-)를 보고한 바 있으나, 상기 효소들은 내열성을 갖지 못하여 산업적으로 이용이 불가능한 문제점이 있다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명자들은 경제적이면서 산업적으로 알룰로스로의 전환수율을 높일 수

있는 방법을 개발하기 위해 예의 노력하였다. 그 결과, 경제적 원료인 수크로스 또는 전분(예컨대, 말토덱스트린)을 싸이코스-6-인산으로 전환시킨 후, 상기 싸이코스-6-인산에 특이적이면서 비가역 반응경로를 수행하는 본 출원의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소(psicose-6-phosphate phosphatase)를 이용하여 싸이코스를 생산하는 경우, 싸이코스 생산 경로에 관여하는 복수의 효소를 동시에 사용 가능한 동시효소반응(one-pot enzymatic conversions)이 가능하고, 싸이코스 전환율을 현저히 높일 수 있음을 확인함으로써 본 출원을 완성하였다. 본 출원의 효소는 기존의 공지된 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소(Panoramic view of a superfamily of phosphatases through substrate profiling, PNAS, 06.04. 2015, Huang 등)에 비해 싸이코스 생산에 있어 보다 적합한 이점을 갖는다.

[7]

과제 해결 수단

- [8] 본 출원의 하나의 목적은 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소를 제공하는 것이다.
- [9] 본 출원의 다른 하나의 목적은 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산을 제공하는 것이다.
- [10] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [11] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스 생산용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 싸이코스-6-인산과 접촉시켜 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환하는 단계를 포함하는 싸이코스 제조방법을 제공하는 것이다.

[13]

발명의 효과

- [14] 본 출원의 신규한 각 효소 및 그 조합은 내열성이 있어 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환하는 경로를 산업적으로 수행할 수 있고, 경제적인 원료인 포도당 또는 전분(예컨대, 말토덱스트린)을 사용하여 싸이코스 합성 경로의 진행을 가능하게 하며, 비가역 반응 경로인 싸이코스-6-인산 탈인산화 반응에 의하여 싸이코스 생산을 가능하게 하는바 싸이코스로의 전환율을 현저히 높일 수 있다. 내열성 효소는 상업적으로 미생물 방지와 고농도 기질 반응이 용이하여 그 효과가 더욱 부가 된다. 또한, 본 제조방법은 싸이코스 전환율 상승에 의하여 반응 결과물이 고농도의 싸이코스를 포함하여 분리정제 공정을 단순화 또는 제거할 수 있는바, 제조방법이 간단하면서도 경제적인 이점이 있다. 특히 SMB를 사용한 분리 등을 안하거나 최소화 가능하여 분리 효율 및 수율을 극대화 할 수

있다.

[15]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[16]

이하, 본 출원 내용에 대하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시한 일 양태의 설명 및 실시형태는 공통된 사항에 대하여 다른 양태의 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 또한, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 더불어, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[17]

[18]

상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소를 제공하는 것이다.

[19]

구체적으로, 본 출원의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소는 아리사이크로바실러스(*Alicyclobacillus*), 아미코라톱시스(*Amicolatopsis*), 아나이로릴네아(*Anaerolinea*), 아르케오글로부스(*Archaeoglobus*), 바실러스(*Bacillus*), 칼디셀룰로시럽터(*Caldicellulosiruptor*), 칼딜리테아(*Caldilinea*), 칼디트릭스(*Caldithrix*), 카르보식도셀라(*Carboxydocella*), 카르복시도테르무스(*Carboxydotherrmus*), 클로로플렉시(*Chloroflexi*), 데플루비토가(*Defluviitoga*), 데이노코커스(*Deinococcus*), 데술푸로코쿠스(*Desulfurococcus*), 디티오글로무스(*Dictyoglomus*), 에푸시바실러스(*Effusibacillus*), 페르비도박테리움(*Fervidobacterium*), 게오바실러스(*Geobacillus*), 할로코커스(*Halococcus*), 하이드로지니비르가(*Hydrogenivirga*), 하이드로지노박터(*Hydrogenobacter*), 히페르써무스(*Hyperthermus*), 코스모토가(*Kosmotoga*), 마리니토가(*Marinitoga*), 메이오써무스(*Meiothermus*), 메소토가(*Mesotoga*), 메탈로스파에라(*Metallosphaera*), 메타노셀라(*Methanocella*), 메타노코코이테스(*Methanococcoides*), 메타노하로비움(*Methanohalobium*), 메타노로부스(*Methanolobus*), 메타노사르키나(*Methanosarcina*), 메타노써무스(*Methanothermus*), 페트로토가(*Petrotoga*), 피크로필러스(*Picrophilus*), 슈도노카르디아(*Pseudonocardia*), 피로코커스(*Pyrococcus*), 피로딕티움(*Pyrodictium*), 로도써무스(*Rhodothermus*), 슬라키아(*Slackia*), 스타피로써무스(*Staphylothermus*), 설펜로버스(*Sulfolobus*), 써마나에로트릭스(*Thermanaerotherrix*), 써모아네로박터(*Thermoanaerobacter*), 써모아네로박테리움(*Thermoanaerobacterium*), 써모비피다(*Thermobifida*), 써모코카스(*Thermococcus*), 써모크리니스(*Thermocrinis*), 써모프렉서스(*Thermoflexus*), 써모토가(*Thermotoga*), 써머스(*Thermus*), 또는 트루페라(*Truepera*) 속 유래의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소일 수 있고, 보다 구체적으로, 아리사이크로바실러스 아시도칼다리우스(*Alicyclobacillus acidocaldarius*), 아리사이크로바실러스 텡쑤첸시스(*Alicyclobacillus tengchongensis*), 아미코라톱시스 써모플라바(*Amicolatopsis thermoflava*), 아나이로릴네아

써모리모사(*Anaerolinea thermolimosa*), 아나이로릴네아 써모필라(*Anaerolinea thermophila*), 아르케오글로부스 푸지두스(*Archaeoglobus fugidus*),
 아르케오글로부스 프로펀두스(*Archaeoglobus profundus*), 아르케오글로부스
 베네페커스(*Archaeoglobus veneficus*), 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 칼디셀룰로시럽터 베스키(*Caldicellulosiruptor bescii*), 칼디리네아
 아에로필라(*Caldilinea aerophila*), 칼디트릭스 아비시(*Caldithrix abyssi*),
 카르보식도셀라 sp. ULO1(*Carboxydocella sp. ULO1*), 카르복시도테르무스
 페리레두센스(*Carboxydothemus ferrireducens*), 클로로플렉시 박테리움 54-19(*Chloroflexi bacterium 54-19*), 데플루비토가 투니시엔시스(*Defluviitoga tunisiensis*),
 데이노코커스 아에리우스(*Deinococcus aerius*), 데이노코커스 아파첸시스(*Deinococcus apachensis*), 데이노코커스 아카틸리스(*Deinococcus aquatilis*),
 데이노코커스 지오써르말리스(*Deinococcus geothermalis*), 데이노코커스
 호피엔시스(*Deinococcus hopiensis*), 데이노코커스 마리코펜시스(*Deinococcus maricopensis*), 데이노코커스 무라이(*Deinococcus murrayi*), 데이토코커스
 레티쿨리테르미티스(*Deinococcus reticulitermitis*), 데이토코커스
 울루무퀴엔시스(*Deinococcus wulumuqiensis*), 데이토코커스 sp. Leaf326(*Deinococcus sp. Leaf326*), 데이토코커스 포에니시스(*Deinococcus phoenicis*),
 데이노코커스 프로테오라이티커스(*Deinococcus proteolyticus*), 데이노코커스 sp.
 17bor-2(*Deinococcus sp. 17bor-2*), 데이노코커스 sp. NW-56(*Deinococcus sp. NW-56*),
 데이노코커스 sp. RL(*Deinococcus sp. RL*), 데이노코커스 sp. YIM 77859(*Deinococcus sp. YIM 77859*), 데술푸로콕쿠스 무코서스(*Desulfurococcus mucosus*),
 딕티오글로무스 투르지둠(*Dictyoglomus turgidum*), 에푸시바실러스 폴리아(*Effusibacillus pohliae*), 페르비도박테리움 곤드와넨스(*Fervidobacterium gondwanense*),
 페르비도박테리움 이스란드쿰(*Fervidobacterium islandicum*), 페르비도박테리움 노도섬(*Fervidobacterium nodosum*), 페르비도박테리움
 페니보란스(*Fervidobacterium pennivorans*), 게오바실러스 sp.(*Geobacillus sp.*),
 게오바실러스 스테아로써모필러스(*Geobacillus stearothermophilus*), 할로코커스
 사리포디네(*Halococcus salifodinae*), 하이드로지니비르가 sp. 128-5-R1-1(*Hydrogenivirga sp. 128-5-R1-1*), 하이드로지노박터 하이드로제노필러스(*Hydrogenobacter hydrogenophilus*),
 하이드로지노박터 써모필러스(*Hydrogenobacter thermophilus*), 히페르테르무스 부티리커스(*Hyperthermus butylicus*), 코스모토가 아레니코랄리나(*Kosmotoga arenicorallina*), 코스모토가
 오레아리아(*Kosmotoga olearia*), 마리니토가 피에조필라(*Marinitoga piezophila*),
 메이오써무스 세르베레우스(*Meiothermus cerbereus*), 메이오써무스
 크리아로필러스(*Meiothermus chliarophilus*), 메이오써무스 루베르(*Meiothermus ruber*), 메이오써무스 실바누스(*Meiothermus Silvanus*), 메이오써무스
 타이와넨시스(*Meiothermus taiwanensis*), 메이오써무스 티미두스(*Meiothermus timidus*), 메이오써무스 루푸스(*Meiothermus rufus*), 메소토가 인페라(*Mesotoga*

infera), 메탈로스파에라 세둘라(*Metallosphaera sedula*), 메타노셀라 콘라디(*Methanocella conradii*), 메타노코코이데스 메틸루텐스(*Methanococcoides methylutens*), 메타노하로비움 에베스티가툼(*Methanohalobium evestigatum*), 메타노로부스 틴다리우스(*Methanlobus tindarius*), 메타노사르키나 시키리아(*Methanosarcina sicilia*), 메타노써무스 페르비두스(*Methanothermus fervidus*), 페트로토가 모빌리스(*Petrotoga mobilis*), 피크로필리스 토리두스(*Picrophilus torridus*), 슈도노카르디아 써모필리아(*Pseudonocardia thermophila*), 피로코커스 퓨리오서스(*Pyrococcus furiosus*), 피로딕티움 오쿨툼(*Pyrodictium occultum*), 로도써무스 마리누스(*Rhodothermus marinus*), 슬라키아 헬리오트리니레두센스(*Slackia heliotrinireducens*), 스타피로써무스 마리너스(*Staphylothermus marinus*), 설포르버스 아시도칼다리우스(*Sulfolobus acidocaldarius*), 써마나에로트릭스 닥센시스(*Thermanaerothermox daxonensis*), 써모아네로박터 sp.(*Thermoanaerobacter* sp.), 써모아네로박터 써모하이드로설퍼리쿠스(*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*), 써모아네로박터 비에게리(*Thermoanaerobacter wiegelii*), 써모아네로박테리움 질라노리티쿰(*Thermoanaerobacterium xylanolyticum*), 써모비피다 하로톨레란스(*Thermobifida halotolerans*), 써모코카스 세레르(*Thermococcus celer*), 써모코카스 리토라리스(*Thermococcus litoralis*), 써모코카스 프로폰두스(*Thermococcus profundus*), 써모크리니스 미네르베(*Thermocrinis minervae*), 써모크리니스 루베르(*Thermocrinis ruber*), 써모프렉서스 후겐홀트지(*Thermoflexus hugenholtzii*), 써모토가 레팅가애(*Thermotoga lettingae*), 써모토가 네아포리타나(*Thermotoga neapolitana*), 써모토가 페트로필리아(*Thermotoga petrophilia*), 써머스 아미로리케파시엔스(*Thermus amyloliquefaciens*), 써머스 필리포르미스(*Thermus filiformis*), 써머스 써모필리스(*Thermus thermophilus*), 또는 트루페라 라디오빅트릭스(*Truepera radiovictrix*) 유래인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[20]

[21] 본 출원에서, "싸이코스-6-인산(psicose-6-phosphate)"은 알룰로스-6-인산(allulose 6-phosphate)로도 알려져 있으며, "싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소"는 싸이코스-6-인산의 인산기를 탈인산화시켜 싸이코스를 생산하는 작용을 하는 효소를 의미한다.

[22] 본 출원의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소는 고농도 전분을 분해하여 싸이코스를 제조함에 있어서, 전분 가공 효소들 및 인산당 전환 효소들과 복합적으로 조합하여 고효율로 싸이코스를 제조하는데 이용될 수 있다.

[23]

[24] 본 출원의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소는 서열번호 1 내지 222 중 어느 하나의 아미노산 서열이거나, 또는 상기 아미노산 서열과 70% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[25] 또한, 서열번호 1, 6, 9, 12, 26, 29, 38 내지 43, 45 내지 53, 56, 57, 59, 60, 64 내지 66,

69, 70, 72, 76, 80, 81, 91 내지 93, 95, 99 내지 103, 113, 114, 116, 117, 131, 134, 136, 142, 145, 146, 148, 164, 167, 169, 172, 177, 184 내지 187, 189, 191, 192, 211, 217, 및 221 중 어느 하나의 아미노산 서열이거나, 또는 상기 아미노산 서열과 70% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[26] 보다 구체적으로는, 서열번호 26, 29, 53, 56, 60, 70, 76, 80, 81, 116, 117, 131, 134, 145, 167, 185, 186, 및 191 중 어느 하나의 아미노산 서열이거나, 또는 상기 아미노산 아미노산 서열과 70% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[27] 또한, 상기 아미노산 서열과 동일한 활성을 갖는 서열은 제한 없이 포함될 수 있다. 또한, 서열번호 1 내지 222 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 이와 80% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 아미노산은 서열번호 1 내지 222의 서열 및 상기 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원의 범위 내에 포함되는 자명하다.

[28] 즉, 본 출원에서 "특정 서열번호로 기재된 아미노산 서열을 갖는 단백질" 이라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 출원에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, 상기 효소와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 상기 아미노산 서열 앞뒤에 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation) 또는 보존적 치환을 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본 출원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.

[29]

[30] 본 출원에서 용어, "상동성(homology)" 또는 "동일성(identity)"은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.

[31] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[32] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드의 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.

- [33] 임의의 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 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 ETA/.,](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [34] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 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)를 나타낸다.
- [35]
- [36] 본 출원의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소는 싸이코스-6-인산에 선택적으로 탈인산화 반응을 하는 효소일 수 있다. 구체적으로 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소는 싸이코스-6-인산과 포도당-1-인산(D-glucose-1-phosphate), 포도당-6-인산(D-glucose-6-phosphate) 또는 과당-6-인산(D-fructose-6-phosphate)을 혼합하였을 시 싸이코스-6-인산에 탈인산화 반응을 하는 효소일 수 있다. 일례로 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소는 동량의 싸이코스-6-인산, 포도당-1-인산,

포도당-6-인산, 및 과당-6-인산을 혼합하였을 때 싸이코스-6-인산의 탈인산화율이 1% 이상, 10% 이상, 또는 30% 이상일 수 있다. 이와 같은 본 출원의 싸이코스-6-인산 탈인산효소의 선택적 활성화에 기인하여 복수의 효소 및 기질을 동시에 사용하는 동시효소반응(one-pot enzymatic conversion)에서 높은 싸이코스 전환율을 나타낼 수 있다.

[37]

[38] 본 출원의 상기 효소 자체 또는 이를 발현하는 DNA를 균주에 형질전환시키고, 이를 배양하여 배양물을 수득하고, 상기 배양물을 파쇄하여, 컬럼 등을 통해 정제한 것일 수 있다. 상기 형질전환용 균주로는 대장균(*Escherichia coli*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 피키아 패스토리스(*Pichia pastoris*) 또는 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)가 있으나, 이에 제한되지 않으며, 항 후 GRAS(Generally Recognized as Safe) 균주 내 형질 전환 가능성이 있을 수 있다.

[39]

[40] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[41] 본 출원에서, "핵산"은 DNA 또는 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체도 포함할 수 있다(참조문헌: Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

[42] 본 출원의 효소를 코딩하는 핵산은 단위체인 뉴클레오타이드가 공유결합에 의해 연결된 DNA 또는 RNA 서열일 수 있고, 구체적으로, 서열번호 1 부터 222의 아미노산 서열의 DNA화 전환시(아미노산을 61개 codon으로 변형)에 가능한 모든 가지 수 중 어느 하나의 뉴클레오타이드 서열일 수 있고, 보다 구체적으로 본 출원의 서열번호 1 내지 222의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열로 번역될 수 있는 각각의 뉴클레오타이드와 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 99% 이상 또는 100%의 상동성, 유사성 또는 동일성을 가지면서, 번역되어 목적하는 효소 활성을 나타낼 수 있는 핵산을 포함할 수 있다. 코돈 축퇴성(codon degeneracy)에 의해 활성이 동일한 단백질, 번역(transcription) 후 아미노산 서열이 동일한, 구체적으로 서열번호 1 내지 222중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 이와 상동성, 유사성, 또는 동일성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 역시 본 출원의 범위에 포함될 수 있음은 자명하다. 보다 구체적으로, 본 출원의 핵산은 서열은 별도 표기하지 않으며, 서열번호 1 내지 222 아미노산 서열로 번역(translation) 가능한 모든 DNA 코돈 가지수로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[43]

- [44] 또한 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 본 출원의 효소를 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [45] 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌 (예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다. 예를 들어, 상동성(homology) 또는 동일성(identity)이 높은 유전자끼리, 80% 이상, 85% 이상, 구체적으로는 90% 이상, 보다 구체적으로는 95% 이상, 더욱 구체적으로는 97% 이상, 특히 구체적으로는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 갖는 유전자끼리 하이브리드화하고, 그보다 상동성 또는 동일성이 낮은 유전자끼리 하이브리드화하지 않는 조건, 또는 통상의 써던 하이브리드화(southern hybridization)의 세척 조건인 60 °C, 1 X SSC, 0.1% SDS, 구체적으로는 60 °C, 0.1 X SSC, 0.1% SDS, 보다 구체적으로는 68 °C, 0.1 X SSC, 0.1% SDS에 상당하는 염 농도 및 온도에서, 1회, 구체적으로는 2회 내지 3회 세정하는 조건을 열거할 수 있다.
- [46] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치 (mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데노신은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 출원은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [47] 구체적으로, 상동성 또는 동일성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55 °C의 T_m 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 T_m 값은 60 °C, 63 °C 또는 65 °C일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.
- [48] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당 기술분야에 잘 알려져 있다(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조).
- [49] 본 출원에서, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 변이형 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 본 출원의 효소를 코딩하는 핵산의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 세포와 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 세포 그 자체에 통합될 수 있다.
- [50] 본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히

한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드, 코스미드, 바이러스 및 박테리오파지를 들 수 있다. 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있다.

[51]

[52] 본 출원은 또 다른 양태는 본 출원의 각 효소를 코딩하는 핵산 또는 본 출원의 효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[53] 본 출원에서, "효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 형질전환체" 또는 "효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 형질전환체"는, 본 출원의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소가 발현되도록 재조합된 미생물을 의미할 수 있다. 예를 들어 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산을 포함하거나, 또는 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환되어 상기 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소를 발현할 수 있는 숙주세포 또는 미생물을 의미한다. 본 출원의 목적상, 상기 형질전환체가 발현하는 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소는 서열번호 1 내지 222 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[54]

[55] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 본 출원의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 핵산이 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 핵산은 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 핵산은 본 출원의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산을 암호화하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 핵산은 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 핵산은 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 핵산에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 핵산은 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[56] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의

싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

- [57] 상기 핵산 또는 벡터의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동 재조합(homologous recombination)에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 염색체 삽입 여부를 확인하기 위한 선별 마커(selection marker)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉 목적 핵산 분자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 변이형 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.
- [58] 본 출원의 벡터를 형질전환 시키는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 레트로바이러스 감염(retroviral infection), 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 상기 숙주 세포로는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주를 사용하는 것이 좋은데, 예를 들어 코리네속 미생물, 에스케리키아속 미생물, 세라티아속 미생물, 바실러스속 미생물, 사카로마이스스세레비제 속 미생물 또는 피키아속 미생물일 수 있고, 구체적으로 대장균(*E. coli*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, GRAS 균주 모두에 적용 가능 하다.
- [60] 보다 구체적으로, 본 출원의 형질전환체는 *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap1 ~ *E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-ap222로 총 222개이다.
- [61]
- [62] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스 생산용 조성물을 제공하는 것이다. 구체적으로, 상기 조성물은 인산당을 추가로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 싸이코스-6-인산을 기질로서 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [63] 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은 싸이코스-6-인산을 탈인산화하여 싸이코스를 생산하는 작용을 하는 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 상기 효소를 발현하는 미생물, 또는 상기 효소를 포함하는 미생물의 배양물을 포함함으로써, 싸이코스-6-인산의 탈인산화를 통해 싸이코스를 제조하는 것일 수 있다.
- [64]
- [65] 또한, 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은, 본 출원의 싸이코스 제조 경로에

관여하는 효소 및/또는 기질[(i) 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합; (ii) 포스페이트(phosphate) 또는 폴리포스페이트(polyphosphate) 또는 기타 인산화 화합물; (iii) 과당-6-인산-3-에피머화 효소; (iv) 포도당-6-인산-이성화효소; (v) 포스포글루코무타아제 또는 포도당 인산화 효소; 및/또는 (vi) α -글루칸 포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제, 수크로오스 포스포릴라아제, α -아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀라아제, 글루코아밀라아제, 알파글루카노트랜스퍼라아제, 폴리포스페이트 글루코카이네이즈또는 수크라아제]; 상기 싸이코스 제조 경로에 관여하는 효소를 발현하는 미생물; 또는 상기 싸이코스 제조 경로에 관여하는 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 추가적으로 포함할 수 있다. 다만, 이는 예시적인 것으로 본 출원의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소를 이용하여 싸이코스를 생산할 수 있다면, 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물에 포함되는 효소 및 싸이코스 생산에 이용되는 기질이 제한되지 않는다.

[66] 구체적으로, 상기 과당-6-인산-3-에피머화 효소는 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 상기 포도당-6-인산-이성화효소는 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 상기 포스포글루코무타아제(phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2)는 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 상기 전분/말토덱스트린 포스포릴라아제(starch/maltodextrin phosphorylase, EC 2.4.1.1) 및 α -글루칸 포스포릴라아제는 포스페이트(phosphate)를 포도당에 인산화 전이시켜 전분 또는 말토덱스트린으로부터 포도당-1-인산을 생산하는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 상기 수크로스 포스포릴라아제(sucrose phosphorylase, EC 2.4.1.7)는 포스페이트를 포도당에 인산화 전이시켜 수크로스로부터 포도당-1-인산을 생산하는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 상기 전분 액당화 효소인 α -아밀라아제(α -amylase, EC 3.2.1.1), 풀루란아제(pullulanase, EC 3.2.1.41), 이소아밀라아제(isoamylase, EC 3.2.1.68), 4- α -글루카노트랜스퍼라아제(4- α -glucanotransferase, EC 2.4.1.25) 및 글루코아밀라아제(glucoamylase, EC 3.2.1.3)는 전분 또는 말토덱스트린을 탈분지화된 말토올리고당 또는 포도당으로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 상기 수크라제(sucrase, EC 3.2.1.26)는 수크로스를 포도당으로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 폴리포스페이트 포도당인산화효소(polyphosphate glucokinase, EC 2.7.1.63)는 폴리포스페이트의 인산을 포도당에 전이시켜 포도당-6-인산으로 전환하는 활성을 가지는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다.

[67] 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물에 포함되는 싸이코스-6-인산 탈인산화효소,

α -글루칸 포스포릴라아제, 포스포글루코뮤타아제(또는 포스포만노뮤타아제), 포도당-6-인산 이성화 효소, 싸이코스-6-인산-3-에피머화효소(또는 리불로스-5-인산-3-에피머화효소), 폴루라네이즈(또는 아이소아밀레이즈), 4- α -글루카노트렌스퍼레아제, 폴리포스페이트 포도당인산화효소 등은 최종 산물인 싸이코스에 대한 부반응이 없거나 적은 것일 수 있다.

[68]

[69] 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소 뿐만 아니라, 싸이코스를 제조하기 위한 복수 개의 효소 및 이의 기질을 적절히 포함할 수 있고, 여러 효소가 존재하는 환경에서도 본 출원의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소는 선택적이고 비가역적으로 싸이코스-6-인산으로부터 싸이코스를 제조할 수 있는 효과를 가진다.

[70]

[71] 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은 당해 싸이코스 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.

[72]

본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은 금속 이온 또는 금속염을 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 금속 이온은 2가 양이온일 수 있으며, 구체적으로 Ni, Mg, Ni, Co, Mn, Fe 및 Zn으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 금속 이온일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은 금속염을 추가로 포함할 수 있으며, 보다 더 구체적으로 상기 금속염은 NiSO_4 , MgSO_4 , MgCl_2 , NiCl_2 , CoSO_4 , CoCl_2 , MnCl_2 , MnSO_4 , FeSO_4 및 ZnSO_4 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[73]

[74] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 싸이코스-6-인산과 접촉시켜 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환하는 단계를 포함하는, 싸이코스 제조방법을 제공하는 것이다.

[75]

구체적으로, 본 출원의 싸이코스 제조방법은 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 싸이코스-6-인산에 접촉하여 싸이코스를 제조하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[76]

[77] 본 출원의 방법은 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환하는 단계 이전, 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 과당-6-인산-3-에피머화 효소, 상기 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [78] 본 출원의 방법은 상기 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당-6-인산(glucose-6-phosphate)에 포도당-6-인산-이성화효소, 상기 포도당-6-인산-이성화효소를 발현하는 미생물 또는 상기 포도당-6-인산-이성화효소를 발현하는 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [79] 본 출원의 방법은 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당-1-인산(glucose-1-phosphate)에 포스포글루코무타아제, 상기 포스포글루코무타아제를 발현하는 미생물 또는 상기 포스포글루코무타아제를 발현하는 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [80] 본 출원의 방법은 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당(glucose)에 폴리포스페이트 포도당 인산화 효소, 상기 폴리포스페이트 포도당 인산화 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 폴리포스페이트 포도당 인산화 효소를 발현하는 미생물의 배양물, 및 폴리포스페이트를 접촉시켜, 상기 포도당을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [81] 본 출원의 방법은 상기 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합에 α -글루칸 포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제 또는 수크로오스 포스포릴라아제; 상기 포스포릴라아제를 발현하는 미생물; 또는 상기 포스포릴라아제를 발현하는 미생물의 배양물, 및 포스페이트를 접촉시켜, 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당-1-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [82] 본 출원의 방법은 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당-1-인산 으로 전환하는 단계 이전, 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합에 α -아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀라아제, 글루코아밀라아제 또는 수크라아제; 상기 α -아밀라아제, 풀루란아제, 글루코아밀라아제, 수크라아제 또는 이소아밀라아제를 발현하는 미생물; 또는 상기 α -아밀라아제, 풀루란아제, 글루코아밀라아제, 수크라아제 또는 이소아밀라아제를 발현하는 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [83] 본 출원의 싸이코스 제조 방법에 이용되는 싸이코스-6-인산 탈인산효소, α -글루칸 포스포릴라아제, 포스포글루코뮤타아제(또는 포스포만노뮤타아제), 포도당-6-인산 이성화효소, 싸이코스-6-인산-3-에피머화효소(또는 리불로스-5-인산-3-에피머화효소), 풀루라네이즈(또는 아이소아밀레이즈), 4- α -글루카노트렌스퍼레이제, 폴리포스페이트 포도당 인산화효소 등은 최종 산물인 싸이코스에 대한 부반응이 없거나 적은 것일 수 있다.
- [84] 본 출원의 싸이코스 제조 방법은 고농도 전분을 분해하여 인산당 전환 효소들과 복합적 조합으로 최적/최대의 싸이코스를 생산하는 것일 수 있고,

싸이코스의 최대 생산성 확보를 위하여 최대 8종류의 효소를 조합하여 사용할 수 있다.

- [85] 첫번째로, 전분을 분해하며 포도당-1-인산을 생산하는 효소인 글루칸 포스포릴라아제(glucan phosphorlase, glycogen phosphorylase, EC 2.4.1.1)는 α -1,4 결합된 전분에 특이적으로 포도당-1-인산(glucose-1-phosphate)을 생성한다. 둘째로는 이렇게 생성된 포도당-1-인산을 포도당-6-인산(glucose-6-phosphate)으로 전환하는 포스포글루코뮤타아제(phosphoglucomutase, EC 2.7.5.1) 또는 포스포만노뮤타아제(phosphomannomutase, EC 5.4.2.8)가 중간 복합 효소 반응에 쓰이게 된다. 세번째 사용 효소로는 포도당-6-인산을 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)으로 전환하는 포도당-6-인산 이성화 효소(glucose-6-phosphate isomerase, EC 5.3.1.9)가 사용된다. 네번째로 앞서 설명된, 과당-6-인산에서 싸이코스-6-인산으로 전환하는 효소인 리불로스-5-인산-3-에피머화효소 또는 싸이코스-6-인산-3-에피머화효소를 활용하여 가역반응의 싸이코스-6-인산까지 생성 가능하다. 전분부터 싸이코스-6-인산 반응까지는 가역 반응으로 일정량 이상 생성이 불가능 하지만, 본 발명에 포함된 싸이코스-6-인산 선택적인 탈인산 효소(psicose-6-phosphate phosphatase) 사용시 높은 수율의 싸이코스 생산이 가능하다.
- [86] 부가적으로 전분 이용율을 높이기 위하여 아밀로펙틴(amylopectin)의 α -1,4 외 α -1,6 결합의 가지(Branch) 결합을 분해하기 위하여 풀루라네이즈(pullulanase, EC 3.2.1.41) 또는 이소아밀레이즈(isoamylase EC 3.2.1.68) 효소가 같이 사용되며, 또한 글루칸 포스포릴라아제의 전분 활용을 높이기 위하여 글루카노트랜스퍼라아제(4- α -glucanotransferase, EC 2.4.1.25)를 활용한다. 상대적으로 활성이 낮은 기질인 맥아당(maltose) 또는 기타 올리고당에 α -1,4 결합형태로 올리고당을 결합하여 세분화된 전분기질의 이용율을 높일 수 있다. 추가적으로 폴리포스페이트 글루코카이네이즈(polyphosphate-glucose phosphotransferase, EC 2.7.1.63)을 사용하여 전분 사용 후 분해된 포도당에서 복합 효소반응을 통하여 추가적인 싸이코스 생산이 가능하여 최대 싸이코스 전환율을 확보 가능하다.
- [87]
- [88] 또한, 본 출원의 제조방법에 있어서, 본 출원의 접촉은 pH 5.0 내지 9.0, 구체적으로 pH 6.0 내지 8.0에서 실시할 수 있다.
- [89] 본 출원의 제조방법에 있어서, 본 출원의 접촉은 40 °C 내지 80 °C 온도, 구체적으로 40 °C 내지 60 °C 또는 50 °C 내지 60 °C 온도에서 실시할 수 있다.
- [90] 본 출원의 제조방법에 있어서, 본 출원의 접촉은 2 시간 내지 24 시간, 구체적으로 6 내지 24 시간~120 시간 동안 실시할 수 있다.
- [91] 본 출원의 제조방법에 있어서, 본 출원의 접촉은 pH 5.0 내지 9.0, 40 °C 내지 80 °C 온도, 및/또는 2 시간 내지 24 시간 동안 실시할 수 있다. 구체적으로, 상기

접촉은 pH 6.0 내지 8.0, 40 °C 내지 60 °C 또는 50 °C 내지 60 °C 온도, 및/또는 6 시간 내지 24 시간~120 시간 동안 실시할 수 있다.

- [92] 본 출원의 제조방법은 싸이코스를 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 출원의 정제는 특별히 제한되지 아니하며, 본 출원의 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법을 사용할 수 있다. 비제한적인 예로, 크로마토그래피, 분별 결정 및 이온 정제 등을 들 수 있다. 상기 정제 방법은 하나만 실시될 수도 있으며, 두 가지 이상의 방법을 함께 실시할 수도 있다. 예를 들어, 크로마토그래피를 통해 싸이코스 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.

- [93] 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 싸이코스 반응물을 얻을 수 있다.

[94]

발명의 실시를 위한 형태

- [95] 이하, 본 출원을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하나, 이는 본 출원의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 출원의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[96]

- [97] 본 출원에서 아미노산은 아래와 같은 약어 또는 아미노산 명으로 표시될 수 있다:

[98] [표1]

아미노산 종류	약어	해당 아미노산으로 코딩 되는 DNA codon	해당 아미노산으로 코딩 되는 RNA codon
알라닌(alanine)	A	GCT, GCC, GCA, GCG	GCU, GCC, GCA, GCG
아르기닌(arginine)	R	AGA, AGG	AGA, AGG
아스파라긴(asparagines)	N	AAT, AAC	AAU, AAC
아스파르트산(aspartic acid)	D	GAT, GAC	GAU, GAC
시스테인(cystein)	C	TGT, TGC	UGU, UGC
글루탐산(glutamic acid)	E	GAA, GAG	GAA, GAG
글루타민(glutamine)	Q	CAA, CAG	CAA, CAG
글라이신(glycine)	G	GGT, GGC, GGA, GGG	GGU, GGC, GGA, GGG
히스티딘(histidine)	H	CAC, CAT	CAC, CAU
이소류신(isoleucine)	I	ATT, ATC, ATA	AUU, AUC, AUA
류신(leucine)	L	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
라이신(lycine)	K	AAA, AAG	AAA, AAG
메티오닌(methionine)	M	ATG	AUG
페닐알라닌(phenylalanine)	F	TTT, TTC	UUU, UUC
프롤린(proline)	P	CCT, CCC, CCA, CCG	CCU, CCC, CCA, CCG
세린(serine)	S	TCT, TCC, TCA, TCG	UCU, UCC, UCA, UCG
트레오닌(threonine)	T	ACT, ACC, ACA, ACG	ACU, ACC, ACA, ACG
트립토판(tryptophan)	W	TGG	UGG
타이로신(tyrosine)	Y	TAT, TAC	UAU, UAC
발린(valine)	V	GTT, GTC, GTA, GTG	GUU, GUC, GUA, GUG

[99]

[100] 실시예 1: 각 효소의 재조합 발현 벡터 및 형질전환 미생물의 제조

[101] 본 출원의 싸이코스 제조 경로에 필요한 각 효소를 제공하기 위하여 내열성의 유전자를 선별하였으며, 이를 정리하면 하기 표 2와 같다.

[102] [표2]

서열번호	종 속	NCBI No.
1	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ACV59297.1
2	<i>Alicyclobacillus tengchongensis</i>	KRW92667.1
3		WP_058093972.1
4	<i>Amicolatopsis thermoflava</i>	WP_017986193.1
5		WP_037323890.1
6	<i>Anaerolinea thermolimosa</i>	WP_084001059.1
7		WP_062189018.1
8		GAP08215.1
9	<i>Anaerolinea thermophila</i>	BAJ62794.1
10		KUK46216.1
11		BAJ63987.1
12	<i>Archaeoglobus fujidus</i>	AAB91288.1
13		AAB89113.1
14		AAB89416.1
15	<i>Archaeoglobus profundus</i>	WP_012940213.1
16	<i>Archaeoglobus veneficus</i>	WP_013683862.1
17	<i>Bacillus licheniformis</i>	AAU41557.1
18		AAU39603.1
19		AAU43073.1
20	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	ACM59531.1
21		ACM59457.1
22		ACM61198.1
23		ACM61211.1
24		ACM60182.1
25	<i>Caldilinea aerophila</i>	BAL98676.1
26		BAM00874.1
27		WP_014433277.1
28	<i>Caldithrix abyssi</i>	APF18124.1
29		APF18744.1
30		APF16831.1
31		WP_006929206.1

[103]

32	<i>Carboxydocella</i> sp. UL01	WP_079933669.1
33	<i>Carboxydotherrnus ferrireducens</i>	WP_028051691.1
34		WP_028051711.1
35		WP_028053062.1
36	<i>Chloroflexi bacterium</i> 54-19	OJW02856.1
37	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	WP_045087739.1
38	<i>Deinococcus aerius</i>	WP_103127908.1
39	<i>Deinococcus apachensis</i>	WP_019584763.1
40	<i>Deinococcus aquatilis</i>	WP_019011981.1
41	<i>Deinococcus geothermalis</i>	WP_011529832.1
42	<i>Deinococcus hopiensis</i>	WP_084049191.1
43	<i>Deinococcus maricopenis</i>	WP_013556873.1
44	<i>Deinococcus murrayi</i>	WP_064542862.1
45		WP_051363537.1
46	<i>Deinococcus reticulitermitis</i>	WP_092263046.1
47	<i>Deinococcus wulumuqiensis</i>	WP_017870657.1
48	<i>Deinococcus</i> sp. Leaf326	WP_056297006.1
49	<i>Deinococcus phoenicis</i>	WP_034353069.1
50	<i>Deinococcus proteolyticus</i>	WP_013614672.1
51	<i>Deinococcus</i> sp. 17bor-2	WP_109826642.1
52	<i>Deinococcus</i> sp. NW-56	WP_104990527.1
53	<i>Deinococcus</i> sp. RL	KEF35131.1
54		WP_081851636.1
55	<i>Deinococcus</i> sp. YIM 77859	WP_034384462.1
56	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	ADV64381.1
57		ADV64382.1
58		ADV64566.1
59	<i>Dictyoglomus turgidum</i>	YP_002352793.1
60		YP_002353123.1
61		YP_002352154.1
62	<i>Effusibacillus pohlise</i>	WP_018132070.1
63	<i>Fervidobacterium gondwanense</i>	WP_072759218.1
64	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	AMW32328.1
65		AMW33413.1

[104]

66	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	ABS60322.1
67		ABS61294.1
68	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	AFG34634.1
69		AFG35917.1
70		WP_064011782.1
71	<i>Geobacillus</i> sp.	WP_011232549.1
72	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ALA69320.1
73		ALA71677.1
74		ALA71036.1
75		ALA70927.1
76		ALA69332.1
77	<i>Halococcus salifodinae</i>	WP_005045395.1
78		EMA49396.1
79		EMA52756.1
80	<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1	WP_008285887.1
81	<i>Hydrogenobacter hydrogenophilus</i>	WP_096602199.1
82		WP_096601840.1
83	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	WP_012963417.1
84	<i>Hyperthermus butylicus</i>	ABM80367.1
85	<i>Kosmotoga arenicorallina</i>	WP_084251417.1
86	<i>Kosmotoga olearia</i>	ACR80305.1
87		ACR80819.1
88	<i>Narinitoga piezophila</i>	AEX84499.1
89		AEX85453.1
90		AEX85799.1
91	<i>Neiothermus cerbereus</i>	WP_027877060.1
92		WP_027878515.1
93	<i>Neiothermus chliarophilus</i>	WP_027892542.1
94		WP_051304156.1
95	<i>Neiothermus ruber</i>	ADD26908.1
96		WP_013013826.1
97		WP_013013825.1
98		WP_013012548.1
99		WP_027883570.1
100	<i>Neiothermus silvanus</i>	ADH63424.1
101		WP_013157023.1
102	<i>Neiothermus taiwanensis</i>	WP_027888084.1
103		WP_027888305.1

[105]

104	<i>Neiothermus timidus</i>	WP_018466213.1
105		WP_018465080.1
106		WP_018467688.1
107		WP_018467518.1
108		WP_018465603.1
109		WP_018466116.1
110		WP_018467797.1
111		WP_018467420.1
112		WP_018466214.1
113		WP_018465420.1
114	<i>Neiothermus rufus</i>	WP_036271046.1
115	<i>Nesotoga infera</i>	EUX90417.1
116	<i>Metallospira sedula</i>	ABP94905.1
117	<i>Methanocella conradii</i>	AFC99407.1
118		WP_014405429.1
119		AFD00405.1
120	<i>Methanococcoides methylutens</i>	WP_048194361.1
121		AKB84306.1
122	<i>Methanohalobium evestigatum</i>	ADI75005.1
123		WP_013193898.1
124	<i>Methanohalobius tindarius</i>	WP_048135864.1
125		WP_048135649.1
126		ETA67773.1
127	<i>Methanosarcina siciliae</i>	WP_048179383.1
128		AKB37722.1
129		AKB35909.1
130	<i>Methanothermobacter fervidus</i>	ADP76907.1
131	<i>Petrotoga mobilis</i>	AEX30802.1
132		EUX15285.1
133	<i>Picrophilus torridus</i>	AAT44010.1
134		AAT43693.1
135	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	WP_073456926.1

[106]

136	<i>Pyrococcus furiosus</i>	AAL80556.1
137		AAL81109.1
138		WP_014835302.1
139		AAL82045.1
140		AAL82122.1
141		AAL81285.1
142		AAL81790.1
143		AAL80346.1
144		AAL80703.1
145		AAL81901.1
146		AAL81913.1
147		AAL80587.1
148		AFN04628.1
149	<i>Pyrodictum occultum</i>	WP_083494490.1
150	<i>Rhodothermus marinus</i>	WP_041806336.1
151		WP_012844425.1
152		ACY47561.1
153		ACY48134.1
154		ACY47672.1
155		ACY48911.1
156		WP_012843092.1
157		WP_012843709.1
158		WP_012844300.1
159		ACY48106.1
160		WP_012844667.1
161		WP_012845116.1
162		WP_012844208.1
163		WP_012843855.1
164		ACY47289.1
165	<i>Slackia heliotrinireducens</i>	WP_012798605.1
166		ACY22623.1
167	<i>Staphylothermus marinus</i>	AEN70247.1
168		AEN69637.1
169		AEN69899.1
170	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	AAV79446.1
171		WP_015385352.1
172		AAV80292.1

[107]

173	<i>Thermanaerotherix daxensis</i>	XPL83857.1
174	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	WP_004400108.1
179	<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i>	WP_013788008.1
180	<i>Thermobifida halotolerans</i>	WP_068689397.1
181		WP_068692137.1
182	<i>Thermococcus celer</i>	WP_088862065.1
183		ASI98087.1
184	<i>Thermococcus litoralis</i>	EHR78031.1
185	<i>Thermococcus profundus</i>	WP_088857759.1
186	<i>Thermocrinis minervae</i>	WP_079653666.1
187	<i>Thermocrinis ruber</i>	AHE95294.1
188	<i>Thermoflexus hugenbottzii</i>	WP_088571736.1
189	<i>Thermotoga lettingae</i>	ABV34293.1
190	<i>Thermotoga neapolitana</i>	WP_015919708.1
191		ACM22182.1
192		ACM22192.1
193		ACM22252.1
194		ACM22284.1
195		ACM22382.1
196		ACM22666.1
197		ACM22704.1
198		ACM22708.1
199		ACM22832.1
200		ACM22990.1
201		ACM23016.1
202		ACM23040.1
203		ACM23081.1
204		ACM23138.1
205		ACM23254.1
206		ACM23323.1
207		ACM23341.1
208		ACM23415.1
209		ACM23510.1
210		ACM23571.1
211		ACM23575.1
212		ACM23847.1
213		ACM23859.1
214		ACM23950.1
215		ACM23957.1
216		ACM24018.1

[108]

217	<i>Thermotoga petrophilia</i>	ABQ45309.1
218	<i>Thermus amyloliquefaciens</i>	WP_038055695.1
219	<i>Thermus filiformis</i>	WP_038062097.1
220	<i>Thermus thermophilus</i>	WP_096411270.1
221		AAS82270.1
222	<i>Truepera radiovictrix</i>	WP_013176662.1

[109]

[110] 상기 선발한 아미노산의 유전자는 유전자 합성 또는 각 분양 균주의 염색체 DNA(genomic DNA)로부터 각각의 유전자를 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용하여 증폭하고, 증폭된 각각의 DNA는 제한효소 NdeI 및 XhoI 또는 Sal I을 사용하여 대장균 발현용 플라스미드 벡터 pET21a(Novagen사)에 삽입하여 제조합 발현벡터를 제작 하였다. 상기 발현벡터는 통상적인 형질전환 방법[참조: Sambrook *et al.* 1989]으로 대장균 (*E. coli*) BL21(DE3) 균주에 각각 형질 전환하여 형질전환 미생물을 제조하였다.

[111] 구체적으로, 서열번호 26, 29, 53, 56, 60, 70, 76, 80, 81, 116, 117, 131, 134, 145, 167, 185, 186, 및 191의 싸이코스-6-인산 탈인산 효소를 대장균 (*E. coli*) BL21(DE3) 균주에 각각 형질전환하여 *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap26, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap29, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap53, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap56, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap60, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap70, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap76, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap80, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap81, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap116, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap117, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap131, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap134, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap145, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap167, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap185, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap186, 및 *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap191 로 명명된 형질전환 미생물을 제조하였다.

[112] 상기 제조된 형질전환 미생물들을 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2018년 11월 14일자로 기탁하여 KCCM12390P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap26), KCCM12391P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap29), KCCM12392P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap53), KCCM12393P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap56), KCCM12394P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap60), KCCM12395P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap70), KCCM12396P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap76), KCCM12397P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap80), KCCM12398P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap81), KCCM12399P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap116), KCCM12400P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap117), KCCM12401P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap131), KCCM12402P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap134), KCCM12403P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap145),

KCCM12404P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap167), KCCM12405P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap185), KCCM12406P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap186), KCCM12407P(*E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ap191)의 기탁 번호를 각각 부여 받았다.

[113]

[114] 실시예 2: 재조합 효소의 제조

[115] 재조합 효소를 제조하기 위해, 실시예 1에서 제조한 각 형질전환 미생물을 LB 액체배지 5 ml를 포함하는 배양 튜브에 접종하고, 600 nm에서 흡광도가 2.0이 될 때까지 37 °C의 진탕 배양기에서 종균 배양을 하였다. 본 종균 배양된 배양액을 LB 액체배지를 포함하는 배양 플라스크에 접종하여 본 배양을 진행하였다. 600 nm에서의 흡광도가 2.0이 될 때 1 mM IPTG를 첨가하여 재조합 효소의 발현생산을 유도하였다. 상기 배양 과정 중의 교반 속도는 180 rpm이며 배양 온도는 37 °C가 유지되도록 하였다. 배양액은 8,000×g로 4 °C에서 20분 동안 원심분리 후 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 2회 세척하였고, 동일 완충용액으로 현탁 후 초음파 세포파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄물은 13,000×g로 4 °C에서 20분 동안 원심분리 후 상등액만을 취하였다. 상기 상등액으로부터 His-tag 친화 크로마토그래피를 사용하여 재조합 효소를 정제하고, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액으로 투석한 후 반응에 사용하였다.

[116]

[117] 실시예 3: 인산당 탈인산 활성화 및 싸이코스-6-인산 탈인산 활성화 분석

[118] 과당-6-인산으로부터 싸이코스-6-인산을 제조한 후 싸이코스-6-인산 탈인산 효소 의한 싸이코스 생산 활성을 확인 또는 포도당-1-인산을 최초 기질로 3개의 효소를 추가적으로 넣어 싸이코스를 검출하여 활성 측정 하였다. 여기서 효소 3개는 포도당-1-인산을 포도당-6-인산(glucose-6-phosphate)으로 전환하는 포스포글루코뮤타아제(phosphoglucomutase, EC 2.7.5.1) 또는 포스포만노뮤타아제(phosphomannomutase, EC 5.4.2.8)와 포도당-6-인산을 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)으로 전환하는 포도당-6-인산 이성화 효소(glucose-6-phosphate isomerase, EC 5.3.1.9) 또한 과당-6-인산에서 싸이코스-6-인산으로 전환하는 효소인 리불로스-5-인산-3-에피머화효소 또는 싸이코스-6-인산-3-에피머화효소를 본 출원의 탈인산 효소 222종 각각과 혼합하여 생성되는 일반당인 포도당, 과당, 싸이코스를 정성 및 정량 평가하여 확인 하였다.

[119]

[120] 구체적으로, 50 mM 과당-6-인산 또는 20 mM 포도당-1-인산을 50 mM Tris-HCl(pH 7.0) 또는 50 mM Sodium-phosphate(pH 6~7) 또는 50 mM Potassium-phosphate(pH 6~7) 완충용액에 현탁한 후, 포스포글루코뮤타아제 또는 포스포만노뮤타아제와 포도당-6-인산 이성화 효소와 리불로스-5-인산-3-에피머화효소 또는 싸이코스-6-인산-3-에피머화효소 및

실시에 2에서 제조한 제조합 싸이코스-6-인산 탈인산 효소 222종을 각각 0.1 unit/ml 첨가하고, 45 °C~70 °C에서 1~24 시간 동안 반응시켰다. HPLC를 이용하여 포도당, 과당, 싸이코스 생성 여부를 분석하였으며, HPLC 분석은 SP_0810(Shodex사) 컬럼과 Aminex HPX-87C(Bio-RAD사) 컬럼을 사용하여 80 °C에서 이동상으로 0.6 ml/min 유속으로 흘려 주면서 수행하였으며, Refractive Index Detector(RID)로 검출하였다.

[121]

[122] 이후, 제조된 포도당-1-인산, 포도당-6-인산, 과당-6-인산 및 싸이코스-6-인산의 혼합액에서 본 출원의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소의 탈인산 활성 및 싸이코스-6-인산 특이적(선택적) 탈인산화율을 측정하였다.

[123] 구체적으로, 0.1 unit/ml의 각각의 본 출원의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소 및 5 mM $MgCl_2$ (또는 $MgSO_4$)을 1 %(w/v) 포도당-6-인산, 포도당-1-인산, 과당-6-인산 및 싸이코스-6-인산의 혼합액에 첨가하여 50 °C에서 12시간 반응시킨 후, HPLC를 이용하여 반응물을 분석하였다. HPLC 분석은 Aminex HPX-87C(Bio-RAD사) 컬럼을 사용하여 80 °C에서 이동상으로 0.6 ml/min 유속으로 흘려 주면서 수행하였고 Refractive Index Detector로 생성된 싸이코스 및 기타당(과당 및 포도당)을 검출하였다.

[124]

[125] 그 결과, 모든 222종 효소 중 69개의 효소에서 싸이코스-6-인산에 대해 높은 선택적 탈인산 활성을 확인하였으며, 45개 효소에서 싸이코스-6-인산의 약한 선택적 탈인산 활성을 확인 하였다. 108개 효소에서는 선택적 싸이코스-6-인산 탈인산 역가는 확인 할 수 없었다. 다만, 222종 중 1개를 제외한 221종의 효소에서 탈인산 활성을 확인하였으며, 이중 113개 효소는 높은 탈인산 활성을 확인하였으며, 108종의 효소에서 낮은 탈인산 활성을 확인 하였다. 한편, 탈인산 역가가 없는 것으로 확인된 서열번호 54의 효소는 탈인산 효소로서 알려져 있으나, 실제로는 탈인산 활성이 없는 것으로 확인되었다. 해당 결과는 하기 표 3과 같이 정리 하였다.

[126]

[127] A = 낮은 활성 (인산당에서 단당으로의 탈인산 전환율이 1% ~ 30%)

[128] B = 높은 활성 (인산당에서 단당으로의 탈인산 전환율이 30% 이상)

[129] C = 없는 활성 (인산당에서 단당으로의 탈인산 전환율이 1% 미만)

[130]

[131] [표3]

서열 번호	종 속	NCBI No.	G1P/G6P/F6P/ P6P 탈인산 활성	P6P(선택적) /G1P+G6P+F6P +P6P 탈인산 활성
1	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ACV59297.1	B	B
2	<i>Alicyclobacillus tengchongensis</i>	KRW92667.1	A	C
3		WP_058093972.1	A	C
4	<i>Amycolatopsis thermoflava</i>	WP_017986193.1	A	C
5		WP_037323890.1	A	C
6	<i>Anaerolinea thermolimosa</i>	WP_084001059.1	B	B
7		WP_062189018.1	A	C
8		GAP08215.1	A	C
9	<i>Anaerolinea thermophila</i>	BAJ62794.1	B	B
10		KUK46216.1	A	C
11		BAJ63987.1	A	C
12	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AAB91288.1	B	B
13		AAB89113.1	B	A
14		AAB89416.1	B	A
15	<i>Archaeoglobus profundus</i>	WP_012940213.1	A	C
16	<i>Archaeoglobus veneficus</i>	WP_013683862.1	A	C
17	<i>Bacillus licheniformis</i>	AAU41557.1	B	A
18		AAU39603.1	B	A
19		AAU43073.1	A	C
20	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i>	ACM59531.1	B	A
21		ACM59457.1	B	A
22		ACM61198.1	B	A
23		ACM61211.1	B	A
24		ACM60182.1	A	C
25	<i>Caldilinea aerophila</i>	BAL98676.1	B	A
26		BAM00874.1	B	B
27		WP_014433277.1	A	C
28	<i>Caldithrix abyssi</i>	APF18124.1	B	A
29		APF18744.1	B	B
30		APF16831.1	A	C
31		WP_006929206.1	A	C
32	<i>Carboxydocella</i> sp. UL01	WP_079933669.1	A	C
33	<i>Carboxydotherrnus ferrireducens</i>	WP_028051691.1	A	C
34		WP_028051711.1	A	C

[132]

35		WP_028053062.1	A	C
36	<i>Chloroflexi bacterium</i> 54-19	OJW02856.1	A	C
37	<i>Defluviitoga tunisiensis</i>	WP_045087739.1	B	A
38	<i>Deinococcus aerius</i>	WP_103127908.1	B	B
39	<i>Deinococcus apachensis</i>	WP_019584763.1	B	B
40	<i>Deinococcus aquatilis</i>	WP_019011981.1	B	B
41	<i>Deinococcus geothermalis</i>	WP_011529832.1	B	B
42	<i>Deinococcus hopiensis</i>	WP_084049191.1	B	B
43	<i>Deinococcus maricopensis</i>	WP_013556873.1	B	B
44	<i>Deinococcus murrayi</i>	WP_084542862.1	B	A
45		WP_051363537.1	B	B
46	<i>Deinococcus reticulitermitis</i>	WP_092263046.1	B	B
47	<i>Deinococcus wulumqiensis</i>	WP_017870657.1	B	B
48	<i>Deinococcus</i> sp. Leaf326	WP_056297006.1	B	B
49	<i>Deinococcus phoenicis</i>	WP_034353069.1	B	B
50	<i>Deinococcus proteolyticus</i>	WP_013614672.1	B	B
51	<i>Deinococcus</i> sp. 17bor-2	WP_109826642.1	B	B
52	<i>Deinococcus</i> sp. NW-56	WP_104990527.1	B	B
53	<i>Deinococcus</i> sp. RL	KEF35131.1	B	B
54		WP_081851636.1	C	C
55	<i>Deinococcus</i> sp. YIM 77859	WP_034384462.1	B	A
56	<i>Desulfurococcus mucosus</i>	ADV64381.1	B	B
57		ADV64382.1	B	B
58		ADV64566.1	A	C
59	<i>Dictyoglomus turgidum</i>	YP_002352793.1	B	B
60		YP_002353123.1	B	B
61		YP_002352154.1	B	A
62	<i>Effusibacillus pohliae</i>	WP_018132070.1	A	C
63	<i>Fervidobacterium gondwanense</i>	WP_072759218.1	A	C
64	<i>Fervidobacterium islandicum</i>	ANW32328.1	B	B
65		ANW33413.1	B	B
66	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	ABS60322.1	B	B
67		ABS61294.1	A	C
68	<i>Fervidobacterium pennivorans</i>	AFG34634.1	A	C
69		AFG35917.1	B	B
70		WP_064011782.1	B	B

[133]

71	<i>Geobacillus</i> sp.	WP_011232549.1	A	C
72	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ALA69320.1	B	B
73		ALA71677.1	B	A
74		ALA71036.1	A	C
75		ALA70927.1	A	C
76		ALA69332.1	B	B
77	<i>Halococcus salifodinae</i>	WP_005045395.1	B	A
78		EMA49396.1	A	C
79		EMA52756.1	A	C
80	<i>Hydrogenivirga</i> sp. 128-5-R1-1	WP_008285887.1	B	B
81	<i>Hydrogenobacter hydrogenophilus</i>	WP_096602199.1	B	B
82		WP_096601840.1	A	C
83	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	WP_012963417.1	A	C
84	<i>Hyperthermus butylicus</i>	ABM80367.1	A	C
85	<i>Kosmotoga arenicorallina</i>	WP_084251417.1	B	A
86	<i>Kosmotoga olearia</i>	ACR80305.1	A	C
87		ACR80819.1	A	C
88	<i>Marinitoga piezophila</i>	AEX84499.1	B	A
89		AEX85453.1	A	C
90		AEX85799.1	A	C
91	<i>Meiothermus cerbereus</i>	WP_027877060.1	B	B
92		WP_027878515.1	B	B
93	<i>Meiothermus chliarophilus</i>	WP_027892542.1	B	B
94		WP_051304156.1	A	C
95	<i>Meiothermus ruber</i>	ADD26908.1	B	B
96		WP_013013826.1	A	C
97		WP_013013825.1	A	C
98		WP_013012548.1	A	C
99		WP_027883570.1	B	B
100	<i>Meiothermus silvanus</i>	ADH63424.1	B	B
101		WP_013157023.1	B	B
102	<i>Meiothermus taiwanensis</i>	WP_027888084.1	B	B
103		WP_027888305.1	B	B

[134]

104	<i>Meiothermus timidus</i>	WP_018466213.1	B	A
105		WP_018465080.1	B	A
106		WP_018467688.1	A	C
107		WP_018467518.1	A	C
108		WP_018465603.1	B	A
109		WP_018466116.1	A	C
110		WP_018467797.1	A	C
111		WP_018467420.1	A	C
112		WP_018466214.1	A	C
113		WP_018465420.1	B	B
114	<i>Meiothermus rufus</i>	WP_036271046.1	B	B
115	<i>Mesotoga infera</i>	KUK90417.1	A	C
116	<i>Metallosphaera sedula</i>	ABP94905.1	B	B
117	<i>Methanocella conradii</i>	AFC99407.1	B	B
118		WP_014405429.1	A	C
119		AFD00405.1	A	C
120	<i>Methanococcoides methylutens</i>	WP_048194361.1	A	C
121		AKB84306.1	A	C
122	<i>Methanohalobium evestigatum</i>	ADI75005.1	B	A
123		WP_013193898.1	A	C
124	<i>Methanlobus tindarius</i>	WP_048135864.1	A	C
125		WP_048135649.1	A	C
126		ETA67773.1	A	C
127	<i>Methanosarcina siciliae</i>	WP_048179383.1	A	C
128		AKB37722.1	A	C
129		AKB35909.1	A	C
130	<i>Methanothermus fervidus</i>	ADP76907.1	A	C
131	<i>Petrotoga mobilis</i>	ABX30802.1	B	B
132		KUK15285.1	A	C
133	<i>Picrophilus torridus</i>	AAT44010.1	B	A
134		AAT43693.1	B	B
135	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	WP_073456926.1	A	C

[135]

136	<i>Pyrococcus furiosus</i>	AAL80556.1	B	B
137		AAL81109.1	A	C
138		WP_014835302.1	A	C
139		AAL82045.1	A	C
140		AAL82122.1	A	C
141		AAL81285.1	A	C
142		AAL81790.1	B	B
143		AAL80346.1	B	A
144		AAL80703.1	B	A
145		AAL81901.1	B	B
146		AAL81913.1	B	B
147		AAL80537.1	B	A
148		AFN04628.1	B	B
149	<i>Pyrodictium occultum</i>	WP_083494490.1	A	C
150	<i>Rhodothermus marinus</i>	WP_041806336.1	B	A
151		WP_012844425.1	B	A
152		ACY47561.1	B	A
153		ACY48134.1	A	C
154		ACY47672.1	B	A
155		ACY48911.1	B	A
156		WP_012843092.1	B	A
157		WP_012843709.1	A	C
158		WP_012844300.1	A	C
159		ACY48106.1	B	A
160		WP_012844667.1	B	A
161		WP_012845116.1	B	A
162		WP_012844208.1	B	A
163		WP_012843355.1	B	A
164		ACY47289.1	B	B
165	<i>Slackia heliotrinireducens</i>	WP_012798605.1	A	C
166		ACY22623.1	A	C
167	<i>Staphylothermus marinus</i>	ABN70247.1	B	B
168		ABN69637.1	A	C
169		ABN69899.1	B	B

[136]

170		AAV79446.1	A	C
171	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	WP_015385352.1	A	C
172		AAV80292.1	B	E
173	<i>Thermanaerothermophilus daxensis</i>	KPL83857.1	B	A
174	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	WP_004400108.1	A	C
175	<i>Thermoanaerobacter</i>	WP_074592559.1	B	A
176	<i>thermohydro sulfuricus</i>	WP_074665888.1	A	C
177		AEM79256.1	B	E
178	<i>Thermoanaerobacter wiegelii</i>	AEM79130.1	A	C
179	<i>Thermoanaerobacterium</i> <i>xyloxyticum</i>	WP_013788008.1	A	C
180		WP_068689397.1	A	C
181	<i>Thermobifida halotolerans</i>	WP_068692137.1	A	C
182		WP_088862065.1	A	C
183	<i>Thermococcus celer</i>	AS198087.1	A	C
184	<i>Thermococcus litoralis</i>	EHR78031.1	B	E
185	<i>Thermococcus profundus</i>	WP_088857759.1	B	E
186	<i>Thermocrinis minervae</i>	WP_079653666.1	B	E
187	<i>Thermocrinis ruber</i>	AHE95294.1	B	E
188	<i>Thermoflexus hugenholtzii</i>	WP_088571736.1	A	C
189	<i>Thermotoga lettingae</i>	ABV34293.1	B	E

[137]

190	<i>Thermotoga neapolitana</i>	WP_015919708.1	A	C
191		ACM22182.1	B	B
192		ACM22192.1	B	B
193		ACM22252.1	A	C
194		ACM22284.1	A	C
195		ACM22382.1	B	A
196		ACM22666.1	A	C
197		ACM22704.1	A	C
198		ACM22708.1	B	A
199		ACM22832.1	A	C
200		ACM22990.1	A	C
201		ACM23016.1	A	C
202		ACM23040.1	A	C
203		ACM23081.1	A	C
204		ACM23138.1	A	C
205		ACM23254.1	A	A
206		ACM23323.1	A	C
207		ACM23341.1	A	C
208		ACM23415.1	A	C
209		ACM23510.1	A	C
210		ACM23571.1	B	A
211		ACM23575.1	B	B
212		ACM23847.1	A	C
213		ACM23859.1	A	C
214		ACM23950.1	B	A
215		ACM23957.1	A	C
216		ACM24018.1	B	A
217	<i>Thermotoga petrophila</i>	ABQ46309.1	B	B
218	<i>Thermus amyloliquefaciens</i>	WP_038055695.1	A	C
219	<i>Thermus filiformis</i>	WP_038062097.1	A	C
220	<i>Thermus thermophilus</i>	WP_096411270.1	A	C
221		AAS82270.1	B	B
222	<i>Truepera radiovictrix</i>	WP_013176662.1	A	C

[138]

[139]

실시예 4: 복합효소(다중효소) 반응을 통한 싸이코스 생산 활성 분석

- [140] 말토텍스트린으로부터 싸이코스 생산을 위해 7개의 효소를 선별하여 동시에(one-pot) 반응시켰다. 7개 효소는 각각 전분을 분해하여 포도당-1-인산으로 전환하는 글루칸 포스포릴레이즈와 전분을 탈분지화하는 풀루라네이즈, 전분 기질 활용도를 높이는 4-알파-글루카노트랜스퍼레이즈, 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환하는 포스포글루코뮤테이즈, 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 글루코스-6-포스페이트 아이소머레이즈, 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 싸이코스-6-포스페이트-3-에피머레이즈와 싸이코스-6-인산으로부터 싸이코스를 생산할 수 있는 서열 1 내지 222 효소를 각각 준비하여 0.1 unit/ml을 사용하였고, 1~5 mM $MgCl_2$, 10~50 mM의 인산나트륨(sodium phosphate pH 7.0)에 5 % (w/v) 말토텍스트린을 첨가하여 온도 50 °C에서 12시간 반응 후 HPLC를 이용하여 반응 결과물에서 싸이코스를 HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석은 Aminex HPX-87C(Bio-RAD사) 컬럼을 사용하여 80 °C에서 이동상으로 0.6 ml/min 유속으로 흘려 주면서 수행하였으며, Refractive Index Detector로 검출하였다.
- [141] 그 결과, 복합효소반응에 의하여 말토텍스트린으로부터 싸이코스가 생성됨을 확인하였다.
- [142]
- [143] 이상의 설명으로부터, 본 출원이 속하는 기술분야의 당업자는 본 출원이 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. 본 출원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 출원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [144]
- [145] 수탁번호
- [146] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [147] 수탁번호 : KCCM12390P
- [148] 수탁일자 : 20181114
- [149]
- [150] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [151] 수탁번호 : KCCM12391P
- [152] 수탁일자 : 20181114
- [153]
- [154] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [155] 수탁번호 : KCCM12392P
- [156] 수탁일자 : 20181114

- [157]
- [158] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [159] 수탁번호 : KCCM12393P
- [160] 수탁일자 : 20181114
- [161]
- [162] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [163] 수탁번호 : KCCM12394P
- [164] 수탁일자 : 20181114
- [165]
- [166] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [167] 수탁번호 : KCCM12395P
- [168] 수탁일자 : 20181114
- [169]
- [170] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [171] 수탁번호 : KCCM12396P
- [172] 수탁일자 : 20181114
- [173]
- [174] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [175] 수탁번호 : KCCM12397P
- [176] 수탁일자 : 20181114
- [177]
- [178] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [179] 수탁번호 : KCCM12398P
- [180] 수탁일자 : 20181114
- [181]
- [182] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [183] 수탁번호 : KCCM12399P
- [184] 수탁일자 : 20181114
- [185]
- [186] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [187] 수탁번호 : KCCM12400P
- [188] 수탁일자 : 20181114
- [189]
- [190] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [191] 수탁번호 : KCCM12401P
- [192] 수탁일자 : 20181114
- [193]
- [194] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

- [195] 수탁번호 : KCCM12402P
- [196] 수탁일자 : 20181114
- [197]
- [198] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [199] 수탁번호 : KCCM12403P
- [200] 수탁일자 : 20181114
- [201]
- [202] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [203] 수탁번호 : KCCM12404P
- [204] 수탁일자 : 20181114
- [205]
- [206] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [207] 수탁번호 : KCCM12405P
- [208] 수탁일자 : 20181114
- [209]
- [210] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [211] 수탁번호 : KCCM12406P
- [212] 수탁일자 : 20181114
- [213]
- [214] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [215] 수탁번호 : KCCM12407P
- [216] 수탁일자 : 20181114
- [217]

[219]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pET-CJ-ap29	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12391P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 11월 14일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 11. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 11월 20일
변리사 손민



[220]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pET-CJ-ap53	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12392P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 11월 14일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 11. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 11월 20일
변리사 손민



[223]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pET-CJ-ap70	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12395P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 11월 14일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 11. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 11월 20일
변리사 손민



[224]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pET-CJ-ap76	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12396P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 11월 14일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 11. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 11월 20일
변리사 손민



[235]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국 제 양 식

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
대한민국 서울시 중구
동호로 330 CJ 제일제당센터
(우) 100-400

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에
따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pET-CJ-ap191	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12407P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2018년 11월 14일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수령	
본 국제기탁기관은 _____에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, _____에 원기탁의 부다덱스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수령하였다.	
V. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 03641	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2018. 11. 14.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2018년 11월 24일
변리사 손민

[236]

청구범위

- [청구항 1] *Alicyclobacillus*, *Amycolatopsis*, *Anaerolinea*, *Archaeoglobus*, *Bacillus*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldilinea*, *Caldithrix*, *Carboxydocella*, *Carboxydotherrnus*, *Chloroflexi*, *Defluviitoga*, *Deinococcus*, *Desulfurococcus*, *Dictyoglomus*, *Effusibacillus*, *Fervidobacterium*, *Geobacillus*, *Halococcus*, *Hydrogenivirga*, *Hydrogenobacter*, *Hyperthermus*, *Kosmotoga*, *Marinitoga*, *Meiothermus*, *Mesotoga*, *Metallosphaera*, *Methanocella*, *Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Methanolobus*, *Methanosarcina*, *Methanothermus*, *Petrotoga*, *Picrophilus*, *Pseudonocardia*, *Pyrococcus*, *Pyrodictium*, *Rhodothermus*, *Slackia*, *Staphylothermus*, *Sulfolobus*, *Thermanaerotherm*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermobifida*, *Thermococcus*, *Thermocrinis*, *Thermoflexus*, *Thermotoga*, *Thermus*, 및 *Truepera* 속으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래의 싸이코스-6-인산의 탈인산화 효소.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 효소는 *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Alicyclobacillus tengchongensis*, *Amycolatopsis thermoflava*, *Anaerolinea thermolimos*, *Anaerolinea thermophila*, *Archaeoglobus fugidus*, *Archaeoglobus profundus*, *Archaeoglobus veneficus*, *Bacillus licheniformis*, *Caldicellulosiruptor bescii*, *Caldilinea aerophila*, *Caldithrix abyssi*, *Carboxydocella* sp. ULO1, *Carboxydotherrnus ferrireducens*, *Chloroflexi bacterium* 54-19, *Defluviitoga tunisiensis*, *Deinococcus aerius*, *Deinococcus apachensis*, *Deinococcus aquatilis*, *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus hopiensis*, *Deinococcus maricopensis*, *Deinococcus murrayi*, *Deinococcus reticulitermitis*, *Deinococcus wulumuqiensis*, *Deinococcus* sp. Leaf326, *Deinococcus phoenicis*, *Deinococcus proteolyticus*, *Deinococcus* sp. 17bor-2, *Deinococcus* sp. NW-56, *Deinococcus* sp. RL, *Deinococcus* sp. YIM 77859, *Desulfurococcus mucosus*, *Dictyoglomus turgidum*, *Effusibacillus pohliae*, *Fervidobacterium gondwanense*, *Fervidobacterium islandicum*, *Fervidobacterium nodosum*, *Fervidobacterium pennivorans*, *Geobacillus* sp., *Geobacillus stearothermophilus*, *Halococcus salifodinae*, *Hydrogenivirga* sp. 128-5-R1-1, *Hydrogenobacter hydrogenophilus*, *Hydrogenobacter thermophilus*, *Hyperthermus butylicus*, *Kosmotoga arenicorallina*, *Kosmotoga olearia*, *Marinitoga piezophila*, *Meiothermus cerbereus*, *Meiothermus chliarophilus*, *Meiothermus ruber*, *Meiothermus silvanus*, *Meiothermus taiwanensis*, *Meiothermus timidus*, *Meiothermus rufus*, *Mesotoga infera*, *Metallosphaera sedula*, *Methanocella conradii*, *Methanococcoides methylutens*, *Methanohalobium evestigatum*, *Methanolobus tindarius*,

Methanosarcina sicilia, *Methanothermobacter fervidus*, *Picrophilus torridus*, *Pseudonocardia thermophila*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrodictium occultum*, *Rhodothermus marinus*, *Slackia heliothermophilus*, *Staphylothermus marinus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermanaerobacter duxensis*, *Thermanaerobacter* sp., *Thermanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Thermanaerobacter wiegelii*, *Thermanaerobacterium xylanolyticum*, *Thermobifida halotolerans*, *Thermococcus celer*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus profundus*, *Thermocrinis minervae*, *Thermocrinis ruber*, *Thermoflexus hugenholtzii*, *Thermotoga lettingae*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermotoga petrophila*, *Thermus amyloliquefaciens*, *Thermus filiformis*, *Thermus thermophilus*, 및 *Truepera radiovictrix*으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래인 것인, 효소.

- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 효소는 서열번호 1 내지 222 중 어느 하나의 아미노산 서열과 70% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 효소.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 효소는 서열번호 1, 6, 9, 12, 26, 29, 38 내지 43, 45 내지 53, 56, 57, 59, 60, 64 내지 66, 69, 70, 72, 76, 80, 81, 91 내지 93, 95, 99 내지 103, 113, 114, 116, 117, 131, 134, 136, 142, 145, 146, 148, 164, 167, 169, 172, 177, 184 내지 187, 189, 191, 192, 211, 217, 및 221 중 어느 하나의 아미노산 서열과 70% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 효소.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 효소는 싸이코스-6-인산 선택적 활성을 나타내는 것인, 효소.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소를 코딩하는 핵산.
- [청구항 7] 제6항의 핵산을 포함하는 형질전환체.
- [청구항 8] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스 생산용 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 조성물은 인산당을 추가로 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 싸이코스-6-인산과 접촉시켜 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환하는 단계를 포함하는, 싸이코스 제조방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 방법은 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환하는 단계 이전, 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 과당-6-인산-3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기

- 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 싸이코스 제조방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 방법은 상기 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당-6-인산(Glucose-6-phosphate)에 포도당-6-인산-이성화효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 싸이코스 제조방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 방법은 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당-1-인산(Glucose-1-phosphate)에 포스포글루코무타아제, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 싸이코스 제조방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 방법은 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당(Glucose)에 폴리포스페이트 포도당 인산화효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물, 및 폴리포스페이트를 접촉시켜, 상기 포도당을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 싸이코스 제조방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 방법은 상기 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합에 α -글루칸 포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제 또는 수크로오스 포스포릴라아제; 이를 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물, 및 포스페이트를 접촉시켜, 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당-1-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 싸이코스 제조방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당-1-인산으로 전환하는 단계는 α -아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀레이즈, α -글루카노트랜스퍼라아제, 글루코아밀라아제 또는 수크라아제; 이를 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물을 추가로 포함하여, 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 말토올리고당 또는 포도당으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 싸이코스 제조방법.
- [청구항 17] 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합, 및 포스페이트에 (a) 제1항의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소; 과당-6-인산-3-에피머화효소; 포도당-6-인산-이성화효소; 포스포글루코무타아제 또는 포도당 인산화효소; 및 α -글루칸 포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제, 수크로오스 포스포릴라아제, α -아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀라아제, 글루코아밀라아제, α -글루카노트랜스퍼라아제, 폴리포스페이트 글루코카이네이즈 또는

수크라아제; 또는 (b) 상기 항목 (a)의 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계를 포함하는, 싸이코스 제조방법.

[청구항 18] 제11항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접촉은 pH 5.0 내지 9.0, 40 °C 내지 80 °C 온도, 및/또는 2 시간 내지 24 시간 또는 120 시간 동안 실시하는, 싸이코스 제조방법.