

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

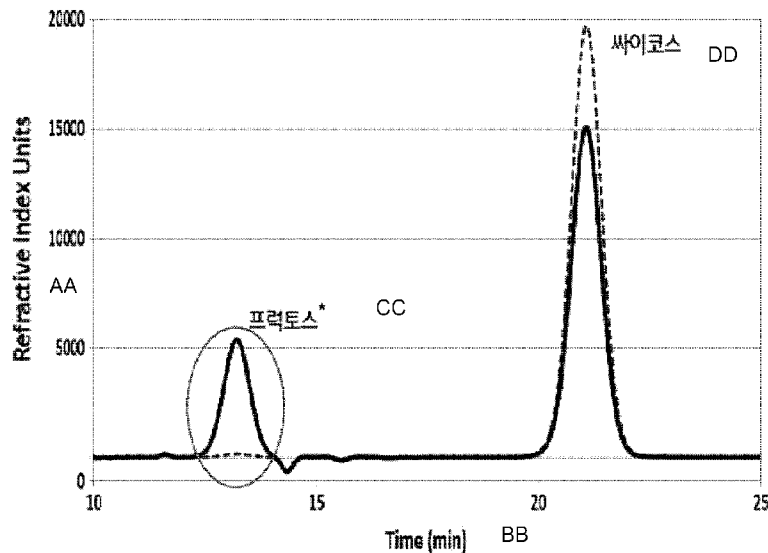
(43) 국제공개일
2020년 11월 26일 (26.11.2020) WIPO | PCT

WO 2020/235830 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 9/90 (2006.01) C12P 19/24 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12P 19/04 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/005701
- (22) 국제출원일: 2020년 4월 29일 (29.04.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2019-0059697 2019년 5월 21일 (21.05.2019) KR
- (71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 윤상영 (YOON, Sang Young); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 손병삼 (SON, Byung-sam); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 조현국 (CHO, Hyun Kug); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 박현준 (PARK, Hyun June); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김승환 (KIM, Seung Hwan); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 양성재 (YANG, Sungjae); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 박일향 (PARK, Il Hyang); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김성보 (KIM, Seong Bo); 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 한얼 (HANOL INTELLECTUAL PROPERTY & LAW); 05836 서울시 송파구 법원로 135, 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: RIBULOSE-PHOSPHATE 3-EPIMERASE MOTIF HAVING LOWER SIDE REACTIVITY AND ENZYME COM-PRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 부반응성이 낮은 리불로스-인산 3-에피머화 효소의 모티프 및 이를 포함하는 효소



AA ... Refractive Index Units
 BB ... Time (min)
 CC ... Fructose
 DD ... Psicose

(57) Abstract: The present application relates to ribulose-phosphate 3-epimerase, a microorganism and composition each comprising same, and a method for producing psicose-6-phosphate or psicose by using same.

(57) 요약서: 본 출원은 리불로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 포함하는 미생물 및 조성물, 이를 이용한 싸이코스-6-인산 또는 싸이코스 제조방법에 관한 것이다

[다음 쪽 계속]



WO 2020/235830 A1

ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 부반응성이 낮은 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 모티프 및 이를 포함하는 효소

기술분야

- [1] 본 출원은 리블로스-인산 3-에피머화 효소로서, 특히 싸이코스 3-에피머화 활성이 낮은 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 포함하는 싸이코스-6-인산 또는 싸이코스 생산용 조성물, 및 이를 이용하여 싸이코스-6-인산 또는 싸이코스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 싸이코스(알룰로스)는 과당(fructose)의 3번 탄소의 에피머로써, 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 싸이코스는 설탕 대체 감미료로 다양한 식품에 사용이 고려되고 있으나, 자연계에 극히 소량 존재하기 때문에 싸이코스를 효율적으로 제조할 수 있는 방법에 대한 필요성이 높아지고 있다.

[5]

- [6] 싸이코스 제조방법 중 하나로, 포도당(glucose) 또는 포도당-1-인산(glucose-1-phosphate), 포도당-6-인산(glucose-6-phosphate) 및 과당-6-인산으로의 전환을 거쳐 싸이코스-6-인산을 생산하는 공정이 알려져 있으나(대한민국 공개 10-2018-0004023), 보다 효율적이고 경제적인 싸이코스 생산을 위한 기술 개발의 요구가 높아지고 있다.

[7]

- [8] 싸이코스 3-에피머화 효소(D-psicose 3-epimerase, EC 5.1.3.30)는 과당(D-fructose)을 3-에피머화(3-epimerization, 3번 탄소 에피머화)함으로써 알룰로스를 생산할 수 있는 효소로 알려져 있다. 상기 효소를 이용하여 단일 효소 반응으로 과당에서 알룰로스를 생산하는 경우, 기질인 과당과 산물인 알룰로스 간에 일정 수준의 반응평형(reaction equilibrium)이 존재한다(산물/기질 = 약 20% 내지 35%). 따라서, 상기 단일 효소 반응을 이용하여 고순도의 알룰로스를 제조하는 경우, 반응 결과물에서 고농도의 과당을 분리하여 제거하는 추가 정제공정이 요구된다.

[9]

- [10] 또한, 기존에 알려진 싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소들은 싸이코스 3-에피머화 활성을 갖고 있기 때문에, 싸이코스-6-인산 3-에피머화 특이적

효소라고 할 수 없으며 실제 싸이코스 생산에도 적합하지 않다 (WO2018/129275, WO2018/112139).

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 출원인은 싸이코스 3-에피머화 활성화에 영향을 줄 수 있는 특이적인 모티프 서열의 조사를 통하여, 특정 모티프들이 특이적으로 싸이코스-6-인산 3-에피머화에 중요하다는 것을 확인하였다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 본 출원의 하나의 목적은 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 제공하는 것이다.

[15] 본 출원의 다른 하나의 목적은 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 코딩하는 핵산을 제공하는 것이다.

[16] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[17] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스-6-인산 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계를 포함하는 싸이코스-6-인산 제조방법을 제공하는 것이다.

[19] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[20] 본 출원의 또 다른 하나의 목적은 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계를 포함하는 싸이코스 제조방법을 제공하는 것이다.

[21]

발명의 효과

[22] 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 특정 모티프를 포함하지 않음으로써 낮은 싸이코스 3-에피머화 활성을 가질 뿐만 아니라, 내열성을 가지므로 싸이코스를 생산하는 등의 산업적 활용에 이점을 갖는다.

[23]

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 리블로스-인산 3-에피머화 효소 (서열번호 9: KPL22606)의 아미노산 서열로부터 예측된 단백질 구조를 나타낸 도이다.

[25] 도 2는 기존의 공지된 싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소 (ADL69228; 실선) 및 본 출원 효소 (서열번호 20; 점선)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 도이다.

[26]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[27] 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.

[28]

[29] 상기 목적을 달성하기 위한 본 출원의 하나의 양태는 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 제공하는 것이다.

[30]

[31] 구체적으로, 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 모티프 I 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 모티프 III을 포함하고, 고활성 및 내열성 리블로스-인산 3-에피머화 효소일 수 있고, 보다 구체적으로, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 모티프 II를 포함하지 않는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[32] 본 출원에서, "리블로스-인산 3-에피머화 효소"는 리블로스-인산 3-에피머화 효소 활성이 공지되었거나 리블로스-인산 3-에피머화 효소 활성이 있는 효소를 의미하며, 특히, 과당-6-인산 3-에피머화 효소 또는 싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소 (psicose-6-phosphate 3-epimerase)로 작용할 수 있는 것을 의미한다. 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 과당-6-인산 3-에피머화 효소 또는 싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소 (psicose-6-phosphate 3-epimerase)의 활성을 갖는 경우 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열도 포함할 수 있다.

[33] 구체적으로, 본 출원의 효소는 싸이코스-6-인산을 과당-6-인산 또는 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 가역적으로 전환하는 활성을 갖는 가역적 전환하는 활성을 갖는 효소로서, 본 출원에서, "리블로스-인산 3-에피머화 효소"는 "싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소" 또는 "효소"와 상호 교환적으로 이용될 수 있다.

[34] 본 출원의 효소는 포도당-1-인산(D-glucose-1-phosphate), 포도당-6-인산(D-glucose-6-phosphate) 또는 과당-6-인산(D-fructose-6-phosphate)을 혼합 하였을시 싸이코스-6-인산으로 전환하는 효소일 수 있다. 일례로 본 출원의 효소는 동량의 싸이코스-6-인산, 포도당-1-인산, 포도당-6-인산, 및 과당-6-인산을 혼합하였을 때 싸이코스-6-인산으로 전환율이 1% 이상, 10% 이상, 또는 30% 이상일 수 있다. 이와 같은 본 출원의 효소의 선택적 활성에 기인하여 복수의

효소 및 기질을 동시에 사용하는 동시효소반응(one-pot enzymatic conversion)에서 높은 사이코스 전환율을 나타낼 수 있다.

[35]

[36] 본 출원에서, "모티프"는 효소 서열 내 특정 서열을 갖는 부위(영역)를 의미하는 것으로, 단백질의 특정 기능 또는 활성을 갖는 서열을 의미할 수 있으며, 미생물 종 간 보존된 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 모티프 I 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 모티프 III을 포함하는 것일 수 있다. 추가적으로, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성된 모티프 II를 포함하지 않는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 모티프 II를 포함하지 않음으로써, 상기 효소는 사이코스-3-에피머화 활성이 낮은 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[37] 구체적으로, 상기 효소는 모티프 I 및 III을 포함하지 않는 효소와 비교하여 사이코스를 과당으로 전환하는 활성이 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하, 1%이하, 또는 활성이 없는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[38]

[39] 또한, 본 출원의 효소는 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열로 구성된 모티프를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[40]

[41] 본 출원의 효소는 특정 모티프를 포함하거나, 필수적으로 포함할 수 있으며, 또한, 특정 모티프를 포함하지 않는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 본 출원의 모티프 I 및 III은 효소가 기질 및/또는 금속 이온(예를 들어, Mg, Mn, Zn 등)과 일부 또는 전부 결합하여 반응하는 부위(결합 부위, binding site)에 포함되어 효소 자체의 활성은 유지하면서 부반응성을 낮추는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 모티프 I 및 III은 상기 결합부위 내 TIM-barrel fold에 포함되는 것일 수 있다. 특정 모티프를 "포함"하는 효소는 해당 모티프 외에 다른 모티프, 도메인, 아미노산 서열, 단편 등을 추가로 포함하거나, 포함하지 않을 수 있으며, 특정 모티프를 "필수적으로 포함"하는 효소는 해당 모티프를 필수적으로 포함하여 목적하는 성질 또는 특성을 얻을 수 있으며, 역시 해당 모티프 외에 다른 모티프, 도메인, 아미노산 서열, 단편 등을 추가로 포함하거나, 포함하지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 특정 모티프를 "포함하지 않는" 효소는 해당 모티프에 해당하는 서열을 효소 내에 포함하지 않으며, 해당 모티프의 위치에 다른 아미노산 서열이 삽입, 치환, 결실 또는 이들의 조합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[42]

[43] 또한, 본 출원의 효소에 포함되거나 포함되지 않는 모티프들은 서로 독립적으로 포함되거나 포함되지 않을 수 있으며, 특정 순서나 위치에 제한적으로 배열되지 않는다.

[44]

[45] 예를 들어, 본 출원의 효소는 서열번호 1의 모티프 I만을 포함하거나; 서열번호 1의 모티프 I, 및 서열번호 3의 모티프 III을 포함하고, 서열번호 2의 모티프 II를 포함하지 않거나; 서열번호 1의 모티프 I, 서열번호 3의 모티프 III, 및 서열번호 4 및 5의 모티프를 포함하고, 서열번호 2의 모티프 II를 포함하지 않는 효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[46]

[47] 본 출원에서, "모티프 I"는 하기 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으나, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열의 활성화에 영향을 미치지 않는 무의미한 아미노산 잔기의 삽입, 치환, 결실 등을 포함하는 서열까지 본 출원의 모티프 I에 해당함은 자명하다.

[48]

[49] 모티프 I(서열번호 1): V-D-G

[50]

[51] 상기 모티프 I은 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 기질 및 금속이온과 반응하는 바인딩 사이트(binding site)에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 모티프는 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 173번 내지 184번 아미노산에 위치하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 모티프 I의 첫 아미노산 잔기인 발린(V)은 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 173번 내지 182번 사이에 위치할 수 있고, 모티프 I의 마지막 잔기인 글리신(G)은 175번 내지 184번 사이에 위치할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[52]

또한 상기 모티프 I은 첫 번째 베타 시트 구조-코일 구조-알파 헬릭스 구조-두 번째 베타 시트 구조가 연결된 도메인에서 두 번째 베타 시트로의 C-말단에서 첫 아미노산 잔기가 시작하는 것일 수 있으며, 상기 도메인은 결합부위에 포함되거나 일부 영역이 겹치는 구조일 수 있다.(도 1).

[53]

[54] 본 출원에서, "모티프 II"는 하기 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으나, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열의 활성화에 영향을 미치지 않는 무의미한 아미노산 잔기의 삽입, 치환, 결실 등을 포함하는 서열까지 본 출원의 모티프 II에 해당함은 자명하다.

[55]

[56] 모티프 II(서열번호 2): M-X-X-D-P-G (X는 임의의 아미노산 잔기)

[57]

[58] 상기 모티프 II는 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단 영역에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 모티프는 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 136번 내지 150번 아미노산에 위치하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기

모티프 II의 첫 아미노산 잔기인 메티오닌(M)은 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 136번 내지 145번 사이에 위치할 수 있고, 모티프 II의 마지막 잔기인 글리신(G)은 141번 내지 150번 사이에 위치할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 모티프 II는 첫 번째 베타 시트 구조-코일 구조-알파 헬릭스 구조-두 번째 베타 시트 구조가 연결된 도메인에서 첫 번째 베타 시트의 C-말단에서 첫 아미노산 잔기가 시작하는 것일 수 있으며, 상기 도메인은 결합부위에 포함되거나 일부 영역이 겹치는 구조일 수 있고, 상기 도메인은 모티프 I을 포함하는 도메인과 동일한 것일 수 있다(도 1).

[59]

[60] 구체적으로, 상기 X에는 임의의 아미노산이 제한 없이 포함될 수 있고, 구체적으로 트레오닌(T), 발린(V)이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 모티프 II는 M-(T/A/M/L)-(V/N/I)-D-P-G의 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[61]

[62] 본 출원에서, "모티프 III"은 하기 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있으나, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열의 활성화에 영향을 미치지 않는 무의미한 아미노산 잔기의 삽입, 치환, 결실 등을 포함하는 서열까지 본 출원의 모티프 III에 해당함은 자명하다.

[63]

[64] 모티프 III(서열번호 3): M-X-X'-P-G (X는 임의의 아미노산 잔기)

[65]

[66] 상기 모티프 III은 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단 영역에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 모티프는 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 136번 내지 150번 아미노산에 위치하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 모티프 III의 첫 아미노산 잔기인 메티오닌(M)은 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 136번 내지 145번 사이에 위치할 수 있고, 모티프 III의 마지막 잔기인 글리신(G)은 141번 내지 150번 사이에 위치할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 모티프 III은 첫 번째 베타 시트 구조-코일 구조-알파 헬릭스 구조-두 번째 베타 시트 구조가 연결된 도메인에서 첫 번째 베타 시트의 C-말단에서 첫 아미노산 잔기가 시작하는 것일 수 있으며, 상기 도메인은 결합부위에 포함되거나 일부 영역이 겹치는 구조일 수 있고, 상기 도메인은 모티프 I을 포함하는 도메인과 동일한 것일 수 있다(도 1).

[67]

보다 구체적으로, 상기 모티프 II 및 III은 본 출원의 효소를 정렬하였을 때 동일한 위치에 포함되는 모티프 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[68]

[69] 구체적으로, 상기 X에는 임의의 아미노산이 제한 없이 포함될 수 있고, 구체적으로 트레오닌(T), 알라닌(A), 메티오닌(M), 류신(L), 발린(V),

아스파라긴(N), 이소류신(I)이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[70] 또한 상기 X'에는 아스파르트산(D)을 제외한 임의의 아미노산이 제한 없이 포함될 수 있고, 구체적으로 아미노산 잔기가 전하가 없거나, 양전하(positive charge)를 갖는 아미노산이 포함될 수 있다. 구체적으로 상기 전하가 없는 아미노산은 극성 아미노산, 비극성 아미노산을 모두 포함하며, 세린, 쓰레오닌, 시스테인, 아스파라긴, 글루타민, 글리신, 알라닌, 프롤린, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌 중 어느 하나일 수 있다. 또한 상기 양전하를 갖는 아미노산은 라이신, 아르기닌, 히스티딘 중 어느 하나일 수 있다. 일례로 아스파라긴(N)과 라이신(K)이 포함될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 모티프 III는 M-(T/A/M/L)-(V/N/I)-N-P-G 의 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[71]

[72] 본 출원의 효소는 하기 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성된 모티프를 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열의 활성에 영향을 미치지 않는 무의미한 아미노산 잔기의 삽입, 치환, 결실 등을 포함하는 서열까지 본 출원의 효소에 포함됨은 자명하다.

[73]

[74] 서열번호 4: S-X-M/I-C (X는 임의의 아미노산 잔기)

[75]

[76] 상기 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 모티프는 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단 영역에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 모티프는 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 5번 내지 20번, 보다 구체적으로, 7번 내지 19번 아미노산에 위치하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 모티프의 첫 아미노산 잔기인 세린(S)은 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 7번 내지 16번 사이에 위치할 수 있고, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 모티프의 마지막 잔기인 시스테인(C)은 10번 내지 19번 사이에 위치할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 서열번호 4의 모티프는 베타시트 구조 이후 형성되는 것일 수 있으며, 구체적으로 베타시트 구조 이후 형성되는 알파 헬릭스 구조에 상기 서열번호 4의 모티프 서열 일부가 포함될 수 있다.

[77]

[78] 구체적으로, 상기 X에는 임의의 아미노산이 제한 없이 포함될 수 있고, 구체적으로 메티오닌, 이소류신, 류신, 또는 발린이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성된 모티프는 SIMC(서열번호 27), SMMC(서열번호 28), SLMC(서열번호 29) 또는 SVMC(서열번호 30) 의 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[79]

- [80] 본 출원의 효소는 하기 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 모티프를 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열의 활성화에 영향을 미치지 않는 무의미한 아미노산 잔기의 삽입, 치환, 결실 등을 포함하는 서열까지 본 출원의 효소에 포함됨은 자명하다.
- [81]
- [82] 서열번호 5: G-X-X-X-X-F/L (X는 임의의 아미노산 잔기)
- [83]
- [84] 상기 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 모티프는 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 C-말단 영역에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단 아미노산으로부터 190 내지 210번, 보다 구체적으로, 196 내지 210 번 아미노산에 위치하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 모티프의 첫 아미노산 잔기인 글리신(G)은 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 N-말단의 첫 아미노산으로부터 196번 내지 205번 사이에 위치할 수 있고, 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 모티프의 마지막 잔기인 페닐알라닌(F)은 201번 내지 210번 사이에 위치할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 서열번호 5의 모티프는 베타시트 구조 이후 형성되는 것일 수 있으며, 구체적으로 베타시트 구조 이후 형성되는 알파 헬릭스 구조에 상기 서열번호 5의 모티프 서열 일부가 포함될 수 있다.
- [85]
- [86] 구체적으로, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 모티프의 각 X는 서로 독립적으로, 쓰레오닌, 세린, 글리신, 류신, 시스테인, 이소류신, 아스파라긴, 라이신, 알라닌, 발린, 또는 글루타민이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 모티프는 GNSGLF(서열번호 31), GSSGLFGSSSLF(서열번호 32), GSTSLF(서열번호 33), GTAGLF(서열번호 34), GTKGLF(서열번호 35), GTQSLF(서열번호 36), GTSCLF(서열번호 37), GTSGLF(서열번호 38), GTSSIF(서열번호 39), GTSGIF(서열번호 40), GTSSLF(서열번호 41) 또는 GTSSVF(서열번호 42)의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 출원의 효소는 서열번호 4 및/또는 5의 모티프를 포함함으로써 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 활성이 높은 것을 특징으로 한다.
- [87] 본 출원의 모티프에 포함되는 각 아미노산 잔기들은 서로 독립적으로 조합되어 모티프를 구성할 수 있다.
- [88]
- [89] 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 특정 모티프, 즉, II를 포함하지 않음으로써 아주 낮은 싸이코스 3-에피머화 활성을 나타낼 수 있으며, 이는 과당-6-인산으로부터 싸이코스-6-인산을 제조하는 과정의 부반응을 낮춤으로써 최종 산물인 싸이코스를 높은 수율로 얻을 수 있음을 시사한다. 또한, 다른

효소(예를 들어, 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소)와의 조합을 통해 싸이코스를 생산하는 데 효과적으로 이용될 수 있다.

[90]

[91] 본 출원의 알파 헬릭스(α -helix) 구조, 베타 시트(β -sheet) 구조, 코일(coil) 구조는 KwangsooKim et. al (Crystal Structure of d-Psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens* and its Complex with True Substrate d-Fructose Volume 361, Issue 5, 1 September 2006, Pages 920-931) 등에서 언급된 바와 같은 통상적인 정의로 이해할 수 있으며, 상기 알파 헬릭스는 Right handed alpha helix일 수 있다. 상기 구조는 NMR, X-ray crystallography 등 통상적으로 알려진 방법에 의해서 직접 수행하거나, 아미노산 서열을 바탕으로 Rosetta 또는 웹서버 (I-TASSER, ROBETTA 등) 를 이용하여 예측하여 얻을 수 있다.

[92] 또한, 본 출원에서 구조가 집합된 도메인은 구조1-구조2와 같은 형태로 표시할 수 있다.

[93]

[94] 또한, 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 크쏘노모나스 (*Chthonomonas*), 지오바실러스 (*Geobacillus*), 마헬라 (*Mahella*), 써모언에어리어박테리움 (*Thermoanaerobacterium*), 테피다네로박터(*Tepidanaerobacter*), 아덴티카테니아(*Ardenticatenia*), 퍼미큐츠(*Firmicutes*), 애리바실러스 (*Aeribacillus*), 이풀로피시움 (*Epulopiscium*), 및 써모플라비마이크로비움 (*Thermoflavimicrobium*) 속으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래의 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 크쏘노모나스 칼리디로세아 (*Chthonomonas calidirosea*) T49, 지오바실러스 속 8 (*Geobacillus sp.* 8), 지오바실러스 써모카테눌라투스 (*Geobacillus thermocatenulatus*), 마헬라 아우스트랄리엔시스 (*Mahella australiensis*) 50-1 BON, 써모언에어로박테리움 PSU-2 (*Thermoanaerobacterium sp.* PSU-2), 써모언에어로박테리움 써모사카로리티쿰 (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*), 테피다네로박터 신트로피쿠스 (*Tepidanaerobacter syntrophicus*), 아덴티카테니아 박테리움 (*Ardenticatenia bacterium*), 퍼미큐츠 박테리움 HGW-Firmicutes-5 (*Firmicutes bacterium* HGW-Firmicutes-5), 애리바실러스 팔리두스 (*Aeribacillus pallidus*), 이풀로피시움 속 SCG-B05WGA-EpuloA1 (*Epulopiscium sp.* SCG-B05WGA-EpuloA1), 및 써모플라비마 이크로비움 디초토미쿰 (*Thermoflavimicrobium dichotomicum*) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[95]

[96] 또한, 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 서열번호 15 내지 26의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것일 수 있고, 또는 서열번호 15 내지 26의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열로 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

보다 구체적으로, 상기 효소는 서열번호 19, 20, 또는 22의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[97] 또는, 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 특정 모티프의 유무가 효소 활성에 중요한 영향을 미치므로, 상기 모티프 영역을 제외한 효소 서열은 서열 간 동일성이 낮을 수 있다. 구체적으로, 상기 아미노산 서열 중 상기 모티프 I 및 III을 제외한 영역과 26%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상, 모티프 I, III, 서열번호 4 및 5의 영역을 제외한 영역과 24%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[98] 또한, 서열번호 15 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열 또는 이와 70% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 아미노산은 서열번호 15 내지 26의 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 범위내에 포함됨은 자명하다.

[99] 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.

[100]

[101] 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.

[102] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호 교환적으로 이용될 수 있다.

[103]

[104] 보존된 (conserved) 폴리뉴클레오티드 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.

- [105] 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.
- [106] 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.
- [107]
- [108] 한편, 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 내열성일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [109] 본 출원에서, "내열성"은 고온 환경에서도 효소의 활성을 잃지 않고 본래의 활성을 나타낼 수 있는 성질을 의미하며, 효소의 내열성은 목적 산물을 생산하는

공정에서 다양한 이점을 갖는다. 구체적으로, 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 40°C 이상, 보다 구체적으로 50°C 이상, 더욱 구체적으로 60°C 이상에서 싸이코스-6-인산 3-에피머화 활성을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더더욱 구체적으로, 본 출원의 효소는 pH 5.0 내지 10.0, 50°C 내지 90°C의 조건에서 1분 내지 24시간 동안 싸이코스-6-인산 3-에피머화 활성을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[110]

[111] 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 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, 향후 GRAS(Generally Recognized as Safe) 균주 내 형질 전환 가능성이 있을 수 있다.

[112] 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소의 정제 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 본 출원의 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법을 사용할 수 있다. 비제한적인 예로, 크로마토그래피, 열처리, 흡착, 여과 및 이온 정제 등을 들 수 있다. 상기 정제 방법은 하나만 실시될 수도 있으며, 두 가지 이상의 방법을 함께 실시할 수도 있다.

[113]

[114] 본 출원의 다른 하나의 양태는 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[115] 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.

[116] 본 출원의 핵산은 단위체인 뉴클레오타이드가 공유결합에 의해 연결된 DNA 또는 RNA 서열일 수 있고, 구체적으로, 서열번호 15 부터 26의 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 15 내지 26의 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 15 내지 26중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 이와

상동성, 유사성, 또는 동일성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 본 출원의 범위에 포함될 수 있음은 자명하다. 보다 구체적으로, 본 출원의 핵산은 서열은 별도 표기하지 않으며, 서열번호 15 내지 26 아미노산 서열로 번역(translation) 가능한 모든 DNA 코돈 가지수로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[117]

[118] 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 제한없이 포함될 수 있다.

[119] 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.

[120] 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.

[121] 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.

[122] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당 기술분야에 잘 알려져 있다.

[123] 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 계놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[124] 본 출원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에서 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.

[125]

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

[127] 본 출원에서, "효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 형질전환체" 또는 "효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 형질전환체"는, 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소가 발현되도록 재조합된 미생물을 의미할 수 있다. 예를 들어 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 코딩하는 핵산을 포함하거나, 또는 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환되어 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 발현할 수 있는 숙주세포 또는 미생물을 의미한다. 본 출원의 목적상, 상기 형질전환체가 발현하는 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 서열번호 15 내지 26 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[128]

[129] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 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 리블로스-인산 3-에피머화 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.

- [130] 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.
- [131] 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.
- [132] 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.
- [133] 상기 숙주 세포로는 DNA의 도입 효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주를 사용하는 것이 좋은데, 예를 들어 코리네속 미생물, 에스케리키아속 미생물, 세라티아속 미생물, 바실러스속 미생물, 사카로마이시스세레비제 속 미생물 또는 피키아속 미생물일 수 있고, 구체적으로 대장균(*E. coli*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, GRAS 균주 모두에 적용 가능하다.
- [134] 보다 구체적으로, 본 출원의 형질전환체는 *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ef7, *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ef12, 또는 *E.coil* BL21(DE3)/pET-CJ-ef15 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [135]
- [136] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스-6-인산 생산용 조성물을 제공한다.
- [137] 본 출원의 싸이코스-6-인산 생산용 조성물은 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 활성을 나타내는 리블로스-인산 3-에피머화

효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하므로, 상기 조성물을 과당-6-인산과 접촉(반응)시킬 경우, 상기 과당-6-인산으로부터 싸이코스-6-인산을 생산할 수 있다.

[138] 구체적으로, 상기 조성물은 과당-6-인산을 기질로서 추가로 포함할 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[139]

[140] 본 출원의 싸이코스-6-인산 생산용 조성물은 싸이코스-6-인산 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.

[141] 본 출원의 싸이코스-6-인산 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 1종 이상의 금속 이온일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 출원의 싸이코스-6-인산 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.

[142]

[143] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계를 포함하는 싸이코스-6-인산 제조방법을 제공한다.

[144] 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 활성을 나타내므로, 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 과당-6-인산과 접촉시킬 경우, 상기 과당-6-인산으로부터 싸이코스-6-인산을 생산할 수 있다.

[145] 상기 과당-6-인산 및 싸이코스-6-인산을 접촉하여 반응시키는 조건은 기질 및 효소 등을 고려하여 당업자가 적절하게 선택하여 실시할 수 있다.

[146] 구체적으로, 상기 과당-6-인산 및 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 접촉시켜 싸이코스-6-인산을 생산하는 단계는 pH 5.0 내지 9.0, 40°C 내지 80°C 온도, 및/또는 2시간 내지 24 시간 동안 수행되는 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 pH 6.0 내지 pH 8.0, 40°C 내지 60°C 온도, 및/또는 20시간 내지 24 시간 동안 수행되는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로는 pH 7.0, 50°C 온도, 24 시간 에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[147] 본 출원의 싸이코스-6-인산 제조방법은 제조된 싸이코스-6-인산을 수득 및/또는 정제하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[148] 상기 싸이코스-6-인산을 수득 및/또는 정제하는 단계는 당업계에 알려진 방법으로 수행될 수 있으며, 특정 방법에 제한되지 않는다.

[149]

[150] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스 생산용 조성물을 제공하는 것이다. 구체적으로, 상기 조성물은 과당-6-인산을 기질로서 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[151]

[152] 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은 과당-6-인산으로부터 싸이코스-6-인산을 제조하는 리블로스-인산 3-에피머화 효소 외에, 싸이코스를 생산하는 데 필요한 효소, 예를 들어, 싸이코스-6-인산의 인산을 탈인산화 하여 싸이코스를 생산하는 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소를 추가로 포함함으로써 싸이코스를 생산하는 것일 수 있다.

[153]

[154] 구체적으로, 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은 포도당-6-인산-이성화효소, 포스포글루코무타아제, 폴리포스페이트 포도당 인산화 효소, α -글루칸 포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제 또는 수크로오스 포스포릴라아제, α -아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀레이즈, α -글루카노트랜스퍼라아제, 글루코아밀라아제, 수크라아제, 및 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 추가로 포함할 수 있고, 구체적으로 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[155]

[156] 보다 구체적으로, 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물은

[157] (a) (i) 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합, 포도당, 포도당-1-인산, 포도당-6-인산, 또는 과당-6-인산; (ii) 포스페이트(phosphate); (iii) 싸이코스-6-인산 탈인산화 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 또는 수크라아제; 또는

[158] (b) 상기 항목 (a)의 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 항목 (a)의 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[159]

다만, 이는 예시적인 것으로 본 출원의 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 이용하여 싸이코스를 생산할 수 있다면, 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물에 포함되는 효소 및 싸이코스 생산에 이용되는 기질이 제한되지 않는다.

[160]

[161] 구체적으로, 본 출원의 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 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. 본 출원의 포스포글루코무타아제(phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2)는 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 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. 본 출원의 포도당-6-인산-이성화효소는 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 본 출원의 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소는 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소는 비가역적으로 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환시키는 활성을 갖는 단백질일 수 있다.

[162] 본 출원의 싸이코스 생산용 조성물에 포함되는 효소는 복수의 효소 및 기질을 동시에 사용하는 동시효소반응(one-pot enzymatic conversion)에서 높은 싸이코스 전환율을 나타낼 수 있다.

[163]

[164] 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.

[165] 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 1종 이상의 금속 이온일 수 있다. 보다 구체적으로, 본 출원의 싸이코스 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.

[166]

[167] 본 출원의 또 다른 하나의 양태는 과당-6-인산에 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계를 포함하는 싸이코스 제조방법을 제공한다.

[168]

[169] 구체적으로, 본 출원의 싸이코스 제조방법은

[170] 과당-6-인산에 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 과당-6-인산을 싸이코스-6-인산으로 전환하는 단계; 및

[171] 상기 싸이코스-6-인산에 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 싸이코스-6-인산과 접촉시켜 싸이코스-6-인산을 싸이코스로 전환하는 단계를 순차로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[172]

[173] 또한, 본 출원의 싸이코스 제조방법은 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.

[174]

본 출원의 싸이코스 제조방법은 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.

[175]

본 출원의 싸이코스 제조방법은 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당(Glucose)에 폴리포스페이트 포도당인산화 효소, 상기 폴리포스페이트 포도당인산화 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.

- [176] 본 출원의 싸이코스 제조방법은 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.
- [177] 본 출원의 싸이코스 제조방법은 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당-1-인산으로 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.
- [178] 본 출원의 싸이코스 제조 방법에 이용되는 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 싸이코스-6-인산 탈인산효소, α -글루칸 포스포릴라아제, 포스포글루코뮤타아제(또는 포스포만노뮤타아제), 포도당-6-인산 이성화 효소, 싸이코스-6-인산-3-에피머화효소(또는 리블로스-5-인산-3-에피머화효소), 풀루라네이즈(또는 아이소아밀레이즈), 4- α -글루카노트렌스퍼레아제, 폴리포스페이트 포도당인산화효소 등은 최종 산물인 싸이코스에 대한 부반응이 없거나 적은 것일 수 있다.
- [179] 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.
- [180] 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-6인산을 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, 본 출원의

과당-6-인산에서 싸이코스-6-인산으로 전환하는 효소인 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 활용하여 가역반응의 싸이코스-6-인산까지 생성 가능하다.

- [181] 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 이용율을 높이기 위하여 글루카노트렌스퍼레이제(4-alpha-glucanotransferase, EC 2.4.1.25)를 활용할 수 있다. 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 가능하다.

[182]

- [183] 또한, 본 출원의 싸이코스 제조방법에 있어서, 본 출원의 접촉은 pH 5.0 내지 9.0, 구체적으로 pH 6.0 내지 8.0에서 실시할 수 있다.

- [184] 본 출원의 싸이코스 제조방법에 있어서, 본 출원의 접촉은 40°C 내지 80°C 온도, 구체적으로 40°C 내지 60°C 또는 50°C 내지 60°C 온도 에서 실시할 수 있다.

- [185] 본 출원의 싸이코스 제조방법에 있어서, 본 출원의 접촉은 2시간 내지 24 시간, 구체적으로 6 내지 24시간 동안 실시할 수 있다.

- [186] 본 출원의 싸이코스 제조방법에 있어서, 본 출원의 접촉은 pH 5.0 내지 9.0, 40°C 내지 80°C 온도, 및/또는 2시간 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 6시간 내지 24시간 동안 실시할 수 있다.

- [187] 본 출원의 싸이코스 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.

- [188] 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.

[189]

발명의 실시를 위한 형태

- [190] 이하, 본 출원을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하나, 이는 본 출원의 이해를

돕기 위한 것일 뿐, 본 출원의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[191]

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

[193]

[194] [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

[195]

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

[197]

[198] 본 출원의 싸이코스 제조 경로에 필요한 각 효소를 제공하기 위하여 내열성 효소의 유전자를 선별하였으며, 추가적으로 고효율성 에피머화 활성을 위하여 S-X-M-C(서열번호 4) 또는 G-X-X-X-X-F(서열번호 5)의 아미노산 서열을 가지는 효소들의 유전자를 선별하였다(표 2).

[199]

[200] 상기 선별한 아미노산의 유전자는 유전자 합성 또는 각 분양 균주의 염색체 DNA (genomic DNA)로부터 각각의 유전자를 중합효소 연쇄반응(PCR)을

이용하여 증폭하고, 증폭된 각각의 DNA는 DNA assembly methods를 사용하여 대장균 발현용 플라스미드 벡터 pET21a (Novagen사)에 삽입하였고, 재조합 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.

[201]

[202] 구체적으로, 서열번호 6 내지 26의 싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소를 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 균주에 각각 형질 전환하였다. 그 중 상기 제조된 방법을 통하여 서열번호 19, 20, 22의 형질전환 미생물들을 국제기탁기관인 한국미생물보존센터(KCCM)에 2019년 4월 16일자로 기탁하여 KCCM12494P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-fep19), KCCM12495P (*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-fep20), KCCM12496P(*E. coli* BL21(DE3)/pET-CJ-fep22)의 기탁 번호를 각각 부여 받았다.

[203]

[204] 실시예 2: 재조합 효소의 제조

[205]

[206] 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.

[207]

[208]

[209] 실시예 3: 싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소의 모델링, 싸이코스 3-에피머화 활성 확인 및 서열 비교

[210]

[211] 리블로스-인산-3-에피머화 효소로 공지된 서열번호 9의 아미노산 서열을 I-TASSER, Phyre2, Galaxyweb server 에 입력하여 단백질 구조를 분석하였다.

[212]

그 결과, 상기 효소가 β -sheet가 중심에 위치하고 그것을 α -helix 구조가 감싸고 있는 TIM-barrel fold 를 가지고 있는 것을 확인하였고, 싸이코스 또는 싸이코스-6-인산 바인딩 사이트로 예상되는 구조(TIM-barrel fold) 내 모티프I

(V-D-G) 과 III (M-X-X-X'-P-G) 를 선정하였다(도 1, Blue dotted circle (motif I), Red dotted circle (motif III) , example structure-model (서열번호 9)).

[213]

[214] 한편, 기존에 알려진 싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소들 (ADL69228, WP_034772999, WP_029098887; WO2018/129275, WO2018/112139)은 싸이코스를 에피머화하여 과당으로 만드는 활성을 나타내기, 싸이코스 생산수율을 저감하게 된다.

[215]

[216] 본 발명자들은 이에, 구조적으로 (M-X-X-D-P-G)의 아스파르트산(D)은 음전하(Negative charge)를 가지고 싸이코스의 3-에피머화 활성에 영향을 줄 것으로 예측하여 싸이코스의 3-에피머화 활성에 영향을 주지 않을 것으로 예측되는 모티프 III(M-X-X-X'-P-G)중 X'이 아스파르트산과 다른 전하를 갖는 N/K를 가진 효소를 선별하였다(WP_085113038, PKM55438, WP_117016900).

[217]

[218] 그 결과, 효소 내 특정 모티프의 종류에 따라 싸이코스 3-에피머화 활성이 달라질 수 있음을 확인 하였다.

[219]

[220] **실시예 4: 리블로스-인산-3-에피머화 효소의 싸이코스-6-인산 전환 활성 확인**

[221]

[222] 본 출원의 싸이코스-6-인산으로 전환하는 효소인 리블로스-인산-3-에피머화 효소의 활성은 50 mM 과당-6-인산 또는 20 mM 포도당-1-인산을 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 또는 50 mM Sodium-posphate (pH 6~7) 또는 50 mM Potassium-posphate (pH 6~7) 완충용액에 현탁한 후, 포스포글루코뮤타아제 또는 포스포만노뮤타아제와 포도당-6-인산 이성화 효소와 싸이코스-6-인산 탈인산 효소 및 실시예 2에서 제조한 재조합 리블로스-인산-3-에피머화 효소를 각각 0.1 unit/ml 첨가하고, 45°C~70°C에서 1~24 시간 동안 반응시켰다.

[223]

[224] 싸이코스 3-에피머화 효소의 활성 분석은 싸이코스를 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 또는 50 mM Sodium-posphate (pH 6~7) 또는 50 mM Potassium-posphate (pH 6~7) 완충용액에 1% (w/v) 농도로 현탁한 후 리블로스-인산-3-에피머화 효소를 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 흘러 주면서 수행하였으며, Refractive Index Detector(RID)로 검출하였으며, 상기의 효소들과 각각 혼합하여 생성되는 일반당인 포도당, 과당, 싸이코스를 정성 및 정량 평가하여 확인 하였다. 정량 평가는 LC감도, 빠른 기질 전환 속도 및 기질 농도에 따른 자연발생적인 실험 오차를 고려하여 초기 싸이코스 농도 비 과당 전환율의 허용 오차를 5% 이내로

설정하였다.

[225]

[226]

표 2는 싸이코스 6 인산 3-에피머화 활성을 나타내는 여러 리블로스-인산-3-에피머화 효소들 가운데, M-X-X-N/K-P-G 및 V-D-G 모티프 유무를 기준으로 싸이코스 3-에피머화 활성이 없는 효소를 구분하였으며, 이로부터 특정 모티프, 구체적으로는 서열번호 1의 모티프를 포함하고, 서열번호 2의 모티프를 포함하지 않고, 대신 동일한 자리에 서열번호 3의 모티프를 포함하는 효소가 싸이코스 6-인산에 특이적으로 높은 에피머화 활성을 갖는 것을 확인하였다. 또한 서열 A, B에서 확인한 바와 같이 Motif I, III이 포함되는 경우 싸이코스 6-인산에 특이적으로 높은 에피머화 활성을 가질 수 있음을 확인하였다.

[227]

[228]

[표2]

서열번호	Genbank No.	Motif III (M-X-X-N/K-P-G)	Motif I (V-D-G)	싸이코스 6 인산 3-에피머화 활성	싸이코스 3-에피머화 활성	
6	ADL69228	X	X	활성 있음	활성 있음	
7	WP_034772999	X	X			
8	WP_029098887	X	0			
9	KPL22606	X	0			
10	PNR87418	X	0			
11	PNR96608	X	X			
12	서열 A*	0	X			
13	WP_074665058	0	X			
14	WP_094397369	X	0			
15	WP_093231204	0	0			활성 없음***
16	서열 B*	0	0			
17	WP_082629565	0	0			
18	WP_025950644	0	0			
19	ABE96948	0	0			
20	WP_085113038	0	0			
21	WP_094046601	0	0			
22	WP_059031935	0	0			
23	PWH13270	0	0			
24	PKM55438	0	0			
25	WP_117016900	0	0			
26	ONI38610	0	0			

*서열 A, B는 리블로스-인산-3-에피머화 효소 서열에 일부 서열 (4~10개의 아미노산)을 삽입함.

*** 활성 없음 : 전환율 5% 이내

[229]

[230] 또한, 본 출원의 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 효소는 과당 생성이 기존의 공지된 싸이코스-6-인산 3-에피머화 효소에 비해 현저히 낮은 것을 확인하였다 (도 2).

[231]

[232] 이는, 상기 모티프의 존재 여부가 알룰로스 생산 수율에 중요한 역할을 담당함을 시사하는 것이다.

[233]

[234] 또한 서열번호 4 및/또는 서열번호 5을 포함하는 서열의 경우 싸이코스 6 인산3-에피머화 활성이 높아지는 것을 확인하였다.

[235]

[236] **실시예 4: 복합효소(다중효소) 반응을 통한 싸이코스 생산 활성 분석**

[237]

[238] 말토덱스트린으로부터 싸이코스를 생산하기 위해 글루칸 포스포릴레이즈, 풀루라네이즈, 4-알파-글루카노트렌스퍼레이즈, 포스포글루코뮤테이즈, 글루코스-6-포스페이트 아이소머레이즈, 싸이코스-6-인산 탈인산 효소, 및 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 동시에 (one-pot) 반응시켰다.

[239]

[240] 구체적으로, 1~5 mM MgCl₂, 10~50 mM의 인산나트륨(Sodium phosphate pH 7.0)에 5 %(w/v) 말토덱스트린을 첨가한 용액에 상기 7종의 효소 각 0.1 unit/ml를 첨가하여 온도 50°C에서 12시간 동안 반응시켰다.

[241]

반응이 완료된 후 HPLC를 이용하여 반응 결과물에서 싸이코스를 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. 그 결과, 복합효소반응에 의하여 말토덱스트린으로부터 싸이코스가 생성됨을 확인하였다.

[242]

[243] [표3]

서열번호	Genbank No.	싸이코스 생성 여부
15	WP_093231204	0
16	서열 B**	0
17	WP_082829565	0
18	WP_025950644	0
19	ABE96948	0
20	WP_085113038	0
21	WP_094046601	0
22	WP_059031935	0
23	PWH13270	0
24	PKM55438	0
25	WP_117016900	0
26	ONI38610	0

[244]

[245]

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.

[246]

[247]

수탁번호

[248]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터

[249]

수탁번호 : KCCM12494P

- [250] 수탁일자 : 20190416
- [251]
- [252] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터
- [253] 수탁번호 : KCCM12495P
- [254] 수탁일자 : 20190416
- [255]
- [256] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터
- [257] 수탁번호 : KCCM12496P
- [258] 수탁일자 : 20190416
- [259]

[260]

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>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-CJ-1ep19	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12494P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학상의 위치 (적용서 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2019년 4월 16일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수행	
본 국제기탁기관은 (원기탁일)에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, (이관청구 수령일)에 상기 기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수행하였다.	
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: 2019. 4. 16.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 5월 21일

변리사 손민



[261]

[262]

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>E. coli</i> BL21(DE3)/pET-CJ-fep20	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12495P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학상의 위치 (적용서 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2019년 4월 16일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수명	
본 국제기탁기관은 (원기탁일) 에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, (이관청구 수령일)에 상기 기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수명하였다.	
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: 2019. 4. 16.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 5월 21일

변리사 손민



[263]

[264]

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국제양식

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>E.coli</i> BL21(DE3)/pET-CJ-fep22	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM12496P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: <input type="checkbox"/> 과학적 성질의 설명 <input type="checkbox"/> 제안된 분류학상의 위치 (적용서 x 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2019년 4월 16일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 이관청구의 수행	
본 국제기탁기관은 (원기탁일)에 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였으며, (이관청구 수령일)에 상기 기탁의 부다페스트 조약하의 기탁으로의 이관청구를 수행하였다.	
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: 2019. 4. 16.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2019년 5월 21일

변리사 손민



[265]

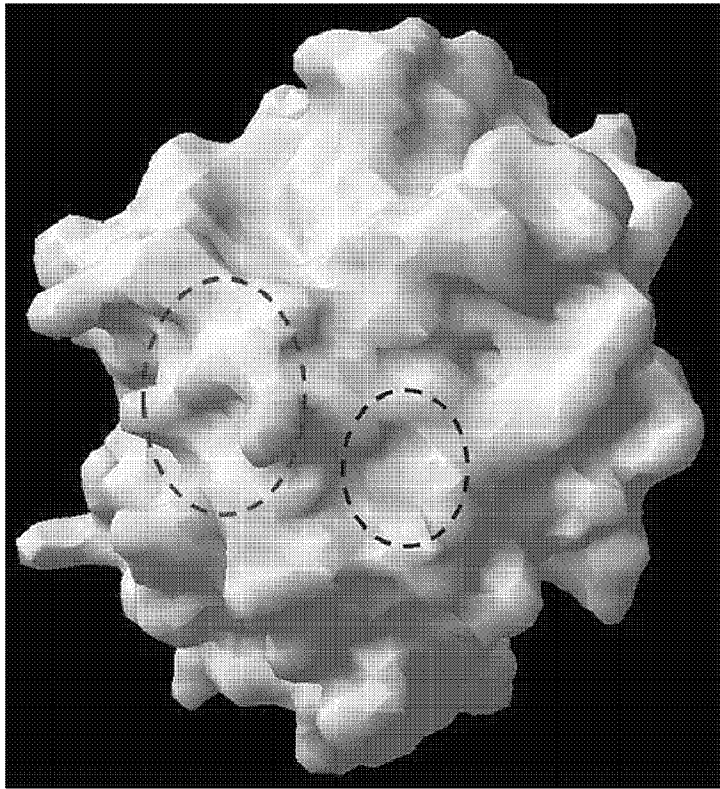
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 모티프 I 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 모티프 III을 포함하는, 리블로스-인산 3-에피머화 효소.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 효소는 싸이코스를 과당으로 전환하는 활성이 없거나, 5% 이내인 것인, 효소.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 효소는 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열로 구성된 모티프를 추가로 포함하는 것인, 효소.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 효소는 N-말단의 아미노산으로부터 173 내지 184번 위치에 모티프 I을 포함하는 것인, 효소.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 효소는 N-말단의 아미노산으로부터 136 내지 150번 위치에 모티프 III을 포함하는 것인, 효소.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 효소는 50°C 내지 90°C의 온도에서 싸이코스-6-인산 3-에피머화 활성을 갖는 것인, 효소.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 효소는 크쏘노모나스 (*Chthonomonas*), 지오바실러스 (*Geobacillus*), 마헬라 (*Mahella*), 썬모언에어리어박테리움 (*Thermoanaerobacterium*), 테피다네로박터 (*Tepidanaerobacter*), 아덴티카테니아 (*Ardenticatenia*), 페미큐츠 (*Firmicutes*), 애리바실러스 (*Aeribacillus*), 이폴로피시움 (*Epulopiscium*), 및 썬모플라비마이크로비움 (*Thermoflavimicrobium*) 속으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래인 것인, 효소.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 효소는 크쏘노모나스 칼리디로세아 (*Chthonomonas calidirosea*) T49, 지오바실러스 속 8 (*Geobacillus sp.* 8), 지오바실러스 썬모카테놀라투스 (*Geobacillus thermocatenulatus*), 마헬라 아우스트랄리엔시스 (*Mahella australiensis*) 50-1 BON, 썬모언에어로박테리움 속 PSU-2 (*Thermoanaerobacterium sp.* PSU-2), 썬모언에어로박테리움 썬모사카로리티쿰 (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*), 테피다네로박터 신트로피쿠스 (*Tepidanaerobacter syntrophicus*), 아덴티카테니아 박테리움 (*Ardenticatenia bacterium*), 페미큐츠 박테리움 HGW-Firmicutes-5 (*Firmicutes bacterium* HGW-Firmicutes-5), 애리바실러스 팔리두스 (*Aeribacillus pallidus*), 이폴로피시움 속 SCG-B05WGA-EpuloA1 (*Epulopiscium sp.* SCG-B05WGA-EpuloA1), 및 썬모플라비마이크로비움 디초토미쿰 (*Thermoflavimicrobium dichotomicum*) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유래인 것인, 효소
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 효소는 서열번호 15 내지 26의 아미노산 서열 및 상기 아미노산 서열 중 상기 모티프 I 및 III를 제외한 영역과 적어도 26% 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의

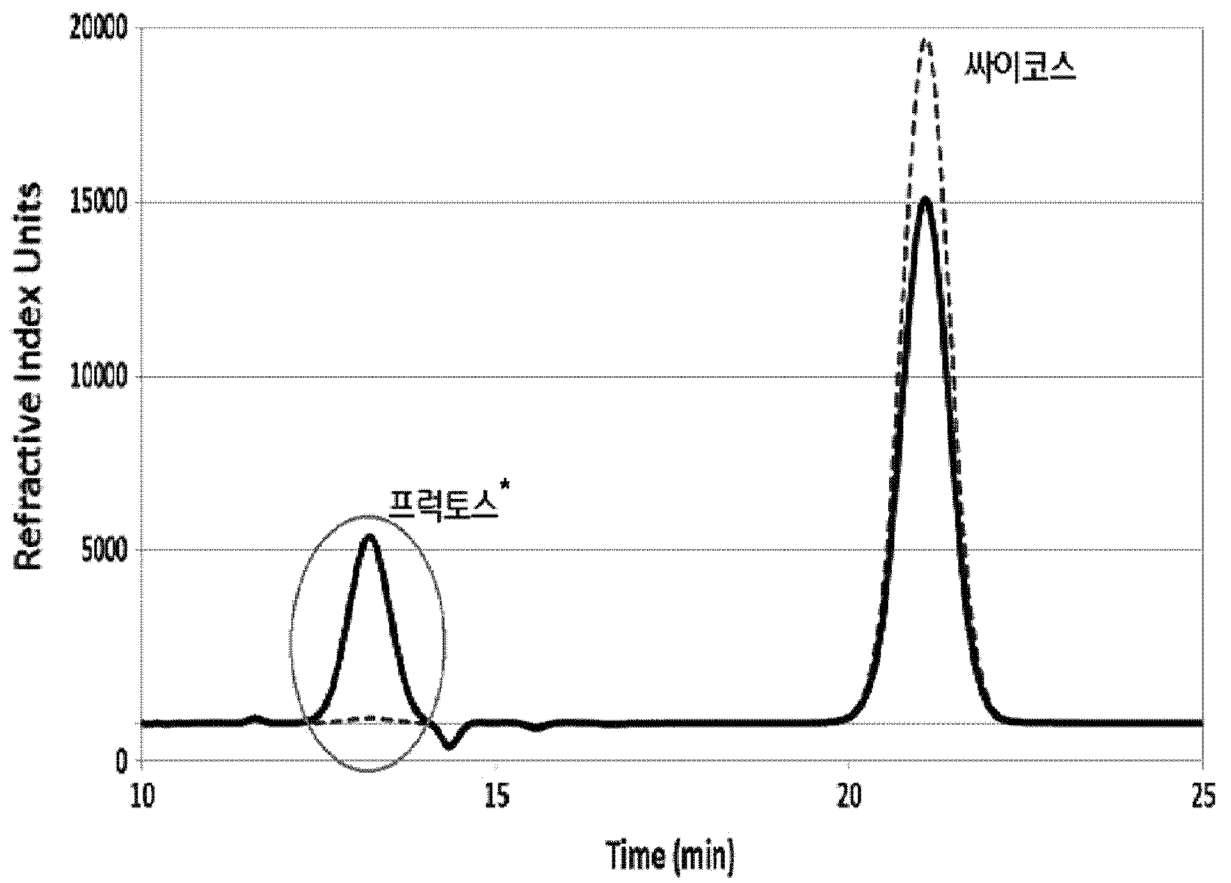
- 서열로 구성되는 것인, 효소.
- [청구항 10] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 리블로스-인산 3-에피머화 효소를 코딩하는 핵산.
- [청구항 11] 제10항의 핵산을 포함하는 형질전환체.
- [청구항 12] 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스-6-인산 생산용 조성물에 있어서, 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 모티프 I 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 모티프 III를 포함하는 것인 싸이코스-6-인산 생산용 조성물.
- [청구항 13] 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계를 포함하는 싸이코스-6-인산 제조방법에 있어서, 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 모티프 I 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 모티프 III를 포함하는 것인 싸이코스-6-인산 제조방법.
- [청구항 14] 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물, 및 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 싸이코스 생산용 조성물에 있어서, 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 모티프 I 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 모티프 III를 포함하는 것인 싸이코스 생산용 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 조성물은 포도당-6-인산-이성화효소, 포스포글루코무타아제, 폴리포스페이트 포도당 인산화 효소, α -글루칸 포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제 또는 수크로오스 포스포릴라아제, α -아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀레이즈, α -글루카노트랜스퍼라아제, 글루코아밀라아제, 수크라아제, 및 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 효소; 이를 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물을 추가로 포함하는 것인, 싸이코스 생산용 조성물.
- [청구항 16] 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 리블로스-인산 3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계; 및 상기 과당-6-인산으로부터 제조된 싸이코스-6-인산을 싸이코스-6-인산 탈인산화 효소, 이를 발현하는 미생물, 또는 상기 미생물의 배양물과 접촉시키는 단계를 포함하는 싸이코스 제조방법에 있어서, 상기 리블로스-인산 3-에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 모티프 I 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 모티프 III를 포함하는 것인 싸이코스 제조방법.

[청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 제조방법은 싸이코스-6-인산으로부터 제조된 싸이코스를 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 제조방법.

[도1]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/005701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/90(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12P 19/24(2006.01)i, C12P 19/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 9/90; C07K 14/00; C12N 1/15; C12N 1/32; C12N 15/52; C12N 9/00; C12P 19/02; C12P 19/24; C12P 19/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: side reactions, ribulose-phosphate 3-epimerases, motifs, psicose-6-phosphate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI GenBank Accession No. WP_093231204.1. ribulose-phosphate 3-epimerase [Thermoflavimicrobium dichotomicum]. 01 August 2017 See the entire document.	1-11
A		12-17
X	WO 2004-042043 A2 (AFFINIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 21 May 2004 See claim 1; sequence identifier nos. 2, 4.	1,9-11
A	WO 2018-132871 A1 (MACQUARIE UNIVERSITY) 26 July 2018 See the entire document.	1-17
A	WO 03-084986 A2 (AFFINIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 16 October 2003 See the entire document.	1-17
A	KR 10-1965509 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 03 April 2019 See the entire document.	1-17
PX	KR 10-2080886 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 24 February 2020 See the entire document.	1-17
* The above document is the registered document for the priority of the present PCT application.		



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 AUGUST 2020 (10.08.2020)

Date of mailing of the international search report

10 AUGUST 2020 (10.08.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/005701

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2004-042043 A2	21/05/2004	AU 2003-280248 A1 WO 2004-042043 A3	07/06/2004 23/12/2004
WO 2018-132871 A1	26/07/2018	None	
WO 03-084986 A2	16/10/2003	AU 2003-213933 A1 AU 2003-213935 A1 AU 2003-213936 A1 AU 2003-213949 A1 AU 2003-213950 A1 CA 2460819 A1 US 2003-0170810 A1 US 2005-0181388 A1 US 2005-0181464 A1 US 2005-0214918 A1 US 2006-0078977 A1 WO 03-025004 A2 WO 03-025156 A2 WO 03-025156 A3 WO 03-025156 A3 WO 03-083099 A2 WO 03-084986 A3 WO 03-087145 A2 WO 03-087146 A2 WO 03-087353 A2 WO 03-087354 A2 WO 2004-011638 A2 WO 2004-011638 A3 WO 2004-058812 A2 WO 2004-058812 A3	13/10/2003 20/10/2003 20/10/2003 27/10/2003 27/10/2003 27/03/2003 11/09/2003 18/08/2005 18/08/2005 29/09/2005 13/04/2006 27/03/2003 27/03/2003 21/08/2003 27/03/2003 09/10/2003 16/10/2003 23/10/2003 23/10/2003 23/10/2003 23/10/2003 05/02/2004 01/07/2004 15/07/2004 23/09/2004
KR 10-1965509 B1	03/04/2019	TW 201923075 A WO 2019-098723 A1	16/06/2019 23/05/2019
KR 10-2080886 B1	24/02/2020	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 9/90(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12P 19/24(2006.01)i, C12P 19/04(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 9/90; C07K 14/00; C12N 1/15; C12N 1/32; C12N 15/52; C12N 9/00; C12P 19/02; C12P 19/24; C12P 19/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 부반응성(side reactions), 리블로스-인산 3-에피머화 효소(ribulose-phosphate 3-epimerases), 모티프(motifs), 싸이코스-6-인산(psicose-6-phosphate)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	NCBI, GenBank Accession No. WP_093231204.1, `ribulose-phosphate 3-epimerase [Thermoflavimicrobium dichotomicum]', 2017.08.01 전체 문헌	1-11
A		12-17
X	WO 2004-042043 A2 (AFFINIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 2004.05.21 청구항 1; 서열번호 2, 4	1,9-11
A	WO 2018-132871 A1 (MACQUARIE UNIVERSITY) 2018.07.26 전체 문헌	1-17
A	WO 03-084986 A2 (AFFINIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 2003.10.16 전체 문헌	1-17
A	KR 10-1965509 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2019.04.03 전체 문헌	1-17
PX	KR 10-2080886 B1 (씨제이제일제당 주식회사) 2020.02.24 전체 문헌 * 본 PCT 출원의 우선권 출원의 등록 공보임	1-17

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 " & " 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2020년 08월 10일 (10.08.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 08월 10일 (10.08.2020)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373
---	------------------------------------

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2004-042043 A2	2004/05/21	AU 2003-280248 A1 WO 2004-042043 A3	2004/06/07 2004/12/23
WO 2018-132871 A1	2018/07/26	없음	
WO 03-084986 A2	2003/10/16	AU 2003-213933 A1 AU 2003-213935 A1 AU 2003-213936 A1 AU 2003-213949 A1 AU 2003-213950 A1 CA 2460819 A1 US 2003-0170810 A1 US 2005-0181388 A1 US 2005-0181464 A1 US 2005-0214918 A1 US 2006-0078977 A1 WO 03-025004 A2 WO 03-025156 A2 WO 03-025156 A3 WO 03-025156 A3 WO 03-083099 A2 WO 03-084986 A3 WO 03-087145 A2 WO 03-087146 A2 WO 03-087353 A2 WO 03-087354 A2 WO 2004-011638 A2 WO 2004-011638 A3 WO 2004-058812 A2 WO 2004-058812 A3	2003/10/13 2003/10/20 2003/10/20 2003/10/27 2003/10/27 2003/03/27 2003/09/11 2005/08/18 2005/08/18 2005/09/29 2006/04/13 2003/03/27 2003/03/27 2003/08/21 2003/03/27 2003/10/09 2003/10/16 2003/10/23 2003/10/23 2003/10/23 2003/10/23 2004/02/05 2004/07/01 2004/07/15 2004/09/23
KR 10-1965509 B1	2019/04/03	TW 201923075 A WO 2019-098723 A1	2019/06/16 2019/05/23
KR 10-2080886 B1	2020/02/24	없음	