

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2014/182054 A1

(43) 국제공개일
2014년 11월 13일 (13.11.2014)

WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/63 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/004033
- (22) 국제출원일: 2014년 5월 7일 (07.05.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0051134 2013년 5월 7일 (07.05.2013) KR
10-2013-0069750 2013년 6월 18일 (18.06.2013) KR
10-2014-0054263 2014년 5월 7일 (07.05.2014) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-713 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김정현 (KIM, Kyoung Heon); 137-779 서울시 서초구 서초중앙로 200 18 동 805 호, Seoul (KR). 최인걸 (CHOI, In-Geol); 156-827 서울시 동작구 남부순환로 263 길 34 501 호, Seoul (KR). 윤은주 (YUN, Eun-Ju); 153-863 서울시 금천구 시흥대로 53 14 동 104 호,

Seoul (KR). 이세영 (LEE, Sae Young); 437-734 경기도 의왕시 호성로 48-7 103 동 1502 호, Gyeonggi-do (KR). 김희택 (KIM, Hee Taek); 695-930 제주도 제주시 한림읍 명상로 106-7, Jeju-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 135-936 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

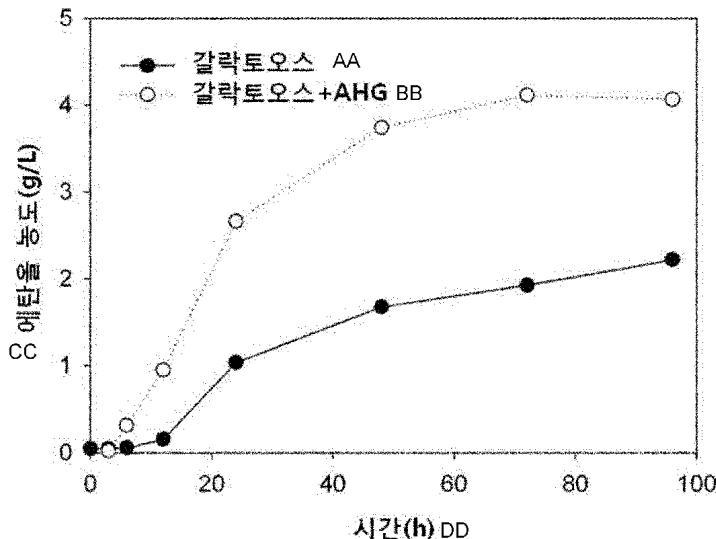
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: RECOMBINANT MICROORGANISM METABOLIZING 3,6-ANHYDRIDE-L-GALACTOSE AND A USE THERE-OF

(54) 발명의 명칭 : 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 재조합 미생물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a recombinant microorganism metabolizing 3,6-anhydride-L-galactose and a use thereof, and, more specifically, can produce ethanol from a recombinant microorganism expressing an enzyme group involved in a metabolic pathway of 3,6-AHG.

(57) 요약서: 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 재조합 미생물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 3,6-AHG의 대사 경로에 관여하는 효소 군을 발현하는 재조합 미생물로부터 에탄올을 제조할 수 있다.

AA ... Galactose
BB ... Galactose + AHG
CC ... Ethanol concentration
DD ... Time (h)



WO 2014/182054 A1

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 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 재조합 미생물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 비발효성당인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 대사하는 재조합 미생물과 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 석유자원의 고갈에 따른 에너지 안보 위기에 따라 전 세계적으로 화석연료를 대체하는 에너지 자원을 개발하기 위한 노력이 이루어지고 있다. 이러한 노력의 일환으로 화석원료를 바이오매스로 대체하여 지속 가능한 탄소경제로 전환하고 기존의 화학공정을 친환경적인 바이오공정으로 대체하여 바이오연료 및 바이오화학소재를 개발하는 연구가 이루어지고 있다. 이는 전후방산업의 패러다임을 전환할 수 있는 새로운 산업 군으로 온실가스 및 폐기물 발생을 저감할 수 있다는 장점이 있다.
- [3] 바이오연료를 생산하기 위한 바이오매스로는 옥수수과 사탕수수와 같은 1세대 당질계 바이오매스에서 목질계 유래의 2세대 바이오매스로 전환되었으며 최근에는 3세대인 해조류 유래 바이오매스가 각광을 받고 있다.
- [4] 해조류 바이오매스 중에서 우뚝가사리와 같은 홍조류는 녹조류와 갈조류에 비해 탄수화물 함량이 많은 것으로 알려져 있으며, 홍조류를 구성하는 주요 다당체인 아가로오스는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 중합체이다. 이 중에서 D-갈락토오스는 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 발효성 단당으로서 화학적 또는 효소적 처리 방법을 사용하여 홍조류 바이오매스를 가수분해하여 생산한 D-갈락토오스를 미생물로 발효하여 바이오 에탄올을 생산하는 연구가 많이 진행되어왔다. 최근에는 아가로오스를 분해하는 미생물인 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40, 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 전환하는 효소를 규명하였다(PCT/KR2012/000607). 뿐만 아니라 비발효성 희귀당으로 알려진 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 탄소원으로 대사할 수 있는 미생물인 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3의 유전체 서열이 밝혀짐에 따라 이 균주가 갖고 있는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 대사 관련 유전자 및 유전자의 기능 또한 밝혀지고 있다.
- [5] 본 발명자들은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조방법과 이의 기능성에 대한 연구들을 보고한바 있다(Yun EJ, et al. *Process Biochem.* (2011) 46(1):88-93. Yun EJ, et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2013) 97(7) 2961-70). 예컨대, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 환원 말단은 쉽게 수화가 되는 특성이 있는데

이로 인하여 보습 기능성을 나타내었다. 또한 미백 및 항산화 기능성이 밝혀졌고, 뿐만 아니라 대장암 예방 효과를 가진 것으로 나타났다(Yun EJ, *et al. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2013) 97(7) 2961-70).

- [6] 그러나 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 일반적으로 미생물이 이용하지 못하는 비발효성 단당으로 알려져 있어 홍조류 바이오매스의 약 60% 이상이 탄수화물로 구성되어 있음에도 바이오연료의 생산 수율이 낮은 주된 원인으로 작용한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사 경로에 관여하는 효소군의 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물 및 상기 재조합 미생물로부터 에탄올을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(3,6-anhydrogalactonic acid cycloisomerase)를 코딩하는 유전자; 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소(2-keto-3-deoxy-galactonic acid kinase)를 코딩하는 유전자; 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제(2-keto-3-deoxy-phosphogalactonic acid aldolase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 에탄올 제조용 재조합 벡터를 제공한다.
- [9] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(3,6-anhydrogalactonic acid cycloisomerase)를 코딩하는 유전자; 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소(2-keto-3-deoxy-galactonic acid kinase)를 코딩하는 유전자; 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제(2-keto-3-deoxy-phosphogalactonic acid aldolase)를 코딩하는 유전자로 형질전환된 에탄올 제조용 재조합 미생물을 제공한다.
- [10] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 미생물을 탄소원으로 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 사용하여 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의 제조방법을 제공한다.
- [11] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 미생물의 배양액 또는 균주 추출액을 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 기질과 반응시켜 피루브산을 제조하는 단계; 및 상기 피루브산을 알코올 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 대사 경로에 관여하는 효소 군을 발현하는 재조합 미생물로부터 에탄올을 제조하는 방법을 제공하는 효과가 있다.
- [13] 따라서, 홍조류 바이오매스를 이용한 고부가 가치의 물질을 생산할 때 생산 수율을 높일 수 있는 핵심 기술로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 또는 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 발현하는 재조합 미생물에서 분리 정제된 효소의 효소 반응산물에 대한 GC-TOF MS로 분석한 결과를 도시한 것으로, A는 기질로 사용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 피크, B는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제의 반응산물인 3,6-안하이드로갈락토닉산의 피크, C는 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 반응산물인 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산의 피크를 나타낸다.
- [15] 도 2는 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 발현하는 재조합 미생물에서 분리 정제된 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제의 효소 반응산물에 대한 2차원 NMR 분석 결과를 나타낸 것으로, A는 2차원 Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy (HSQC) NMR 분석 결과이고, B는 2차원 Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) NMR 분석결과이다.
- [16] 도 3은 본 발명의 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 발현하는 재조합 미생물에서 분리 정제된 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 효소 반응산물에 대한 GC-TOF MS 분석 및 2차원 NMR 분석 결과로, A는 2-케토-3-데옥시-글루콘산 표준물질의 GC-TOF MS의 매스 스펙트럼 분석 결과, B는 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 효소 반응산물의 1차원 수소 NMR 분석 결과, C는 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 효소 반응산물의 2차원 HMBC NMR 분석 결과, D는 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 효소 반응산물의 2차원 HMBC NMR의 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [17] 도 4는 탄소원으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 사용한 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 각각 또는 동시에 발현하는 재조합 미생물의 성장 실험 결과이다.
- [18] 도 5는 탄소원으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(a), 갈락토오스(b), 또는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스를 함유한 아가로오스 가수분해물(c)을 사용한 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 각각

- 또는 동시에 발현하는 재조합 미생물의 호기 조건에서의 성장 실험 결과이다.
- [19] 도 6은 GC-FID를 이용한 에탄올의 정량 분석 곡선을 나타낸 것이다.
- [20] 도 7은 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 각각 또는 동시에 발현하는 재조합 미생물의 발효 조건에서 성장 실험 결과(a), 기질 소비량 측정 결과(b), 발효에 의해 생성된 에탄올의 정량 분석 결과(c)이다.
- [21] 도 8은 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제, 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소, 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 동시에 발현하는 재조합 미생물의 탄소원에 따른 성장 실험 결과이다.
- [22] 도 9는 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제, 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소, 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 동시에 발현하는 재조합 미생물의 발효 조건에서 성장 실험 결과이다.
- [23] 도 10은 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제, 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소, 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 동시에 발현하는 재조합 미생물의 발효에 의해 생성된 에탄올의 정량 분석 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [25] 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(3,6-anhydrogalactonic acid cycloisomerase)를 코딩하는 유전자; 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소(2-keto-3-deoxy-galactonic acid kinase)를 코딩하는 유전자; 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제(2-keto-3-deoxy-phosphogalactonic acid aldolase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 에탄올 제조용 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [26] 본 발명의 에탄올 제조용 재조합 벡터는 갈락토오스 및/또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하, '3,6-AHG'라 함)를 기질로 하여 최종 산물로 에탄올을 제조할 수 있는 것을 특징으로 한다. 보다 구체적으로, 상기 재조합 벡터는 3,6-AHG를 대사하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제를 코딩하는 유전자, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 데히드로게나제에 의해 생산되는 3,6-안하이드로갈락토닉산의 환 구조를 개환시키면서 이성질화하여 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산으로 전환하는 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소, 상기 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산을 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산으로 인산화시키는

2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소, 및 상기
 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산을 피루브산으로 분해시키는
 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌리아제를 코딩하는 유전자군을
 포함하고 있다. 상기 피루브산은 알코올 발효의 출발물질로 이용되어 발효를
 거쳐 최종적으로 에탄올을 생성하는 것이다.

- [27] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제는 3,6-AHG를
 3,6-안하이드로갈락토닉산으로 전환하는 효소로, 비브리오 속(*Vibrio sp.*) EJY3,
 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40, 또는
 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c 등의 유래인
 것일 수 있고, 예를 들어, 비브리오 속(*Vibrio sp.*) EJY3 유래의 SEQ ID NO: 1의
 염기서열 및 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [28] 상기 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소는
 3,6-안하이드로갈락토닉산의 환 구조를 개환시키면서 이성질화하여
 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산으로 전환하는 효소로, 비브리오 속(*Vibrio sp.*) EJY3,
 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40, 또는
 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c 등의 유래인
 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus
 degradans*) 2-40 유래의 SEQ ID NO: 3의 염기서열(아미노산 서열: SEQ ID NO: 4),
 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c 유래의 SEQ ID
 NO: 5의 염기서열(아미노산 서열: SEQ ID NO: 6), 비브리오 속(*Vibrio sp.*) EJY3
 유래의 SEQ ID NO: 7의 염기서열(아미노산 서열: SEQ ID NO: 8) 중 어느 하나로
 표시될 수 있다.
- [29] 본 발명자들은 AHG 대사효소 중 하나인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스
 디하이드로게나제와 클러스터를 이루는 유전자들을 유전공학 기법을 사용하여
 각각의 단백질들의 획득하고 효소반응을 실시한 결과,
 3,6-안하이드로갈락토닉산(이하 'AHGA'라 함)으로부터 화학양론의 변화없이
 선형의 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산을 생성하는 3,6-안하이드로 갈락토닉산
 시클로이성질화효소를 최초로 동정하였다.
- [30] 따라서, 본 발명은 SEQ ID NOS: 4, 6 또는 8의 아미노산 서열 중 어느 하나로
 표시되는 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(3,6-anhydrogalactonic
 acid cycloisomerase)을 포함하는 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 생산용 조성물을
 또한 제공한다.
- [31] 또한, 본 발명은 SEQ ID NOS: 4, 6 또는 8의 아미노산 서열 중 어느 하나로
 표시되는 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(3,6-anhydrogalactonic
 acid cycloisomerase), 상기 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를
 생산하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양산물을 3,6-안하이드로갈락토닉산과
 반응시켜 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산을 생산하는 방법을 제공한다.
- [32] 상기 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소는

2-케토-3-데옥시-갈락토닉산을 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산으로 인산화시키는 효소로, 비브리오 속(*Vibrio sp.*) EJY3, 사카로파거스 테그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40, 또는 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c 등의 유래인 것일 수 있고, SEQ ID NO: 9의 염기서열 및 SEQ ID NO: 10의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

- [33] 상기 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제는 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산을 피루브산으로 분해시키는 효소로, 비브리오 속(*Vibrio sp.*) EJY3, 사카로파거스 테그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40, 또는 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c 등의 유래인 것일 수 있고, SEQ ID NO: 11의 염기서열 및 SEQ ID NO: 12의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.
- [34] 상술한 유전자들은 효소의 물리 화학적 활성을 갖고 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예컨대, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 또는 11에 기재된 어느 하나의 뉴클레오티드를 포함하고, 효소의 물리 화학적 특성을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. '엄격한 조건하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드'라 함은, 예컨대 설명서에 기술된 조건하(0.5×SSC를 포함하는 일차 세척 완충액으로 42°C에서 세척)에서 ECL 직접 핵산 표지화 및 검출 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여, 효소 단백질로부터 임의적으로 선택된 적어도 20, 바람직하게는 적어도 30의 연속적 잔기(예를 들어, 40, 60 또는 100 연속 잔기)의 서열을 포함하는 하나 이상의 프로브 DNAs에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. '분리된 뉴클레오티드'라 함은 천연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드에 비해 상이한 형태로 존재하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 다른 생물체의 게놈에 통합된 벡터 및 폴리뉴클레오티드는 상기 분리된 폴리뉴클레오티드에 포함된다. 또한, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, PCR 산물, 또는 제한 단편으로서 얻어진 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 부분으로서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 '분리된 폴리뉴클레오티드'에 또한 포함된다.
- [35] 상술한 본 발명의 효소들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 하기 방법에 의해 분리할 수 있다: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 또는 11의 뉴클레오티드 서열에 기초한 각각의 PCR 프라이머를 설계하고, 주형(template)으로서 효소-생산 균주 유래의 염색체 DNA나 cDNA 라이브러리를 이용한 PCR을 수행하여 본 발명의 DNA를 얻는다.
- [36] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 프로브로서 얻어진 DNA 단편을 이용하여, 콜로니 혼성화, 플라크 혼성화 등으로, (a) 효소-생산 균주에서 유래된 염색체 DNA의 제한효소 단편을 파지나 플라스미드에 도입하고 상기 파지나

백터로 대장균 세포를 형질전환하여 얻어진 라이브러리, 또는 (b) cDNA 라이브러리에 대한 스크리닝을 수행함으로써 제조할 수 있다.

- [37] 택일적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR로 얻어진 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 분석; 알려진 DNA 서열의 외부에 가닥(strand)을 신장하기 위해 분석된 서열에 기초한 PCR 프라이머의 설계; 및 적절한 제한효소로 효소-생산 균주의 염색체 DNA의 소화 및 주형으로서 상기 DNA를 이용하는 자가환화 반응(self-cyclizing reaction)에 의한 역-PCR을 수행함으로써 얻어질 수 있다(*Genetics*, 120, 621-623 (1988)). 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RACE 방법으로 얻어질 수 있다(Rapid Amplification of cDNA End, 'PCR Jikken Manual (Manual for PCR experiments)', 25-33, HBJ Publishing Bureau).
- [38] 상기 방법으로 클로닝된 게놈 DNA 및 cDNA에 더하여, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 합성된 DNAs를 포함한다.
- [39] 본 발명에서 "제조합 백터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 백터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 상기 백터는 플라스미드 백터, 코즈미드 백터, 박테리오파아지 백터 또는 바이러스 백터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현백터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 백터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현백터는 백터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현백터인 경우 복제 기원을 포함한다.
- [40] 본 발명의 제조합 백터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 백터에 상술한 효소 코딩 핵산을 각각 또는 함께 삽입함으로써 제조될 수 있다. 상기 대장균 균주 발현용 백터는 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균주 발현용 백터가 제한 없이 사용될 수 있다.
- [41]
- [42] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 코딩하는 유전자; 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(3,6-anhydrogalactonic acid cycloisomerase)를 코딩하는 유전자; 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소(2-keto-3-deoxy-galactonic acid kinase)를 코딩하는 유전자; 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제(2-keto-3-deoxy-phosphogalactonic acid aldolase)를 코딩하는 유전자로 형질전환된 에탄올 제조용 제조합 미생물에 관한 것이다.
- [43] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation),

원형질 융합, 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

- [44] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.
- [45] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵생물이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스퍼질러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등의 진핵생물이 사용될 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 상기 형질전환체는 상기 유전자들을 포함하는 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다.
- [46] 보다 구체적으로, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환될 수 있다.
- [47] 또는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 코딩하는 유전자 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환될 수 있다.
- [48] 또는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 코딩하는 유전자, 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 코딩하는 유전자, 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소를 코딩하는 유전자 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환될 수 있다.
- [49] 본 발명에 따른 재조합 미생물은 발효 균주일 수 있다.
- [50]
- [51] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 미생물을 탄소원으로 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 사용하여 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의 제조방법에 관한 것이다.
- [52] 본 발명에 따른 재조합 미생물은 알코올 발효의 출발물질인 피루브산을 생산할 수 있어 3,6-AHG를 대사할 수 있는 효소들로부터 탄소원으로 갈락토오스

및/또는 3,6-AHG를 사용하여 발효 조건에서 에탄올을 생성할 수 있다.

[53] 상기 발효 시 유도물질로 아라비노스를 사용할 수 있다.

[54]

[55] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 재조합 미생물의 배양액 또는 균주 추출액을 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 기질과 반응시켜 피루브산을 제조하는 단계; 및 상기 피루브산을 알코올 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의 제조방법에 관한 것이다.

[56] 본 발명에 따른 재조합 미생물은 3,6-AHG를 대사할 수 있는 효소 균을 발현할 수 있고, 상기 재조합 미생물의 배양액 또는 균주 추출액에는 이러한 효소 균이 포함되어 있어 갈락토오스 및/또는 3,6-AHG를 기질로 제공하여 반응시킬 경우 피루브산을 생산할 수 있다. 상기 피루브산은 알코올 발효의 출발물질로 발효 조건에서 에탄올을 생산할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[57] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[58]

[59] <실시예 1> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 재조합 미생물의 제조

[60] 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 유래 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 클로닝하였다. 이를 위해, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 코딩 유전자(ORF Names: VEJY3_09240)에 대한 염기서열 정보를 기반으로 다음과 같은 프라이머 세트를 제작하였다.

[61] 정방향 프라이머 1: 5'-gaaggagatataaggatgaaacgttaccaaagtacgttg-3'(SEQ ID NO: 13)

[62] 역방향 프라이머 2: 5'-atgatggtgatggtggtcgaattcacatagaatgtcttc-3'(SEQ ID NO: 14)

[63] 중합효소연쇄반응을 통해 증폭된 각각의 효소 유전자는 pBAD (Invitrogen, Product no. V440-01) 벡터와 아미노 말단에 6개의 히스티딘 잔기가 부가된 변형된 pET21 α (이하 pJL) 벡터에 클로닝한 다음 발현용 대장균인 대장균(*E. coli*) BL21 (DB3)에 형질전환하여 발현시켰다. 이때 사용한 중합효소연쇄반응 조건은 다음과 같다. 1) 초기 변성 조건(Initial denaturation): 97°C, 30초, 2) 어닐링 조건: 35 사이클: 97°C, 10초 - 57°C, 1분 - 72°C, 2분, 3) 최종 연장 조건(final extension): 72°C, 5분.

[64] pBAD 벡터에 클로닝한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제는 유도제로 0.2%(w/v) 아라비노스를 이용하여 16°C, 200rpm 조건에서 18시간 동안 발현을 유도하였다. 대장균(*E. coli*) BL21에서 과발현 시킨 효소는 His-trap 컬럼을 사용하여 정제하였다.

[65] 상기 정제된 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 200 μ g을

10mM의 3,6-AHG 및 1.5mM의 NADP 보조인자와 함께 20mM Tris-HCl(pH 7.4)에서 30°C에서 1시간 동안 반응시키고, 반응산물은 GC-TOF MS(gas chromatography-time of flight mass spectrometry)로 분석하고, 2차원 NMR(nuclear magnetic resonance) 분석을 통해 화학 구조를 규명하였다.

- [66] 상기 GC-TOF MS 분석을 위해 건조시킨 효소 반응산물에 유도체화 반응을 실시하였다. 40mg/mL의 메톡시아민 하이드로클로라이드(methoxyamine hydrochloride)를 피리딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 녹인 용액에 5 μ l 넣어준 후 30°C에서 90분간 반응시켰다. 그 후 45 μ l의 *N*-메틸-*N*-트리메틸실릴트리플루오로아세트아마이드(*N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide, Fluka, Buchs, Switzerland)를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 유도체화시킨 샘플은 Agilent 7890 A GC(Agilent Technologies, Wilmington, DE) coupled to a Pegasus HT TOF MS(LECO, St. Joseph, MI)를 사용하여 분석하였다. RTX-5Sil MS 컬럼(30m \times 0.25mm, 0.25- μ m film thickness; Restek, Bellefonte, PA)을 사용하였으며 1 μ l의 샘플을 비분할 모드(splitless mode)로 주입(injection)하였다. 오븐 온도는 처음에 50°C에서 1분간 머무름 시간을 주었고, 그 후에 20°C/min의 속도로 330°C까지 승온시킨 후 5분간 머무름 시간을 주었다. 이온 소스(Ion source) 온도는 250°C였고, 트랜스퍼 라인(transfer line)의 온도는 280°C였다. 매스 스펙트럼(Mass spectra)의 스캔 범위는 85-500 m/z였다.
- [67] 반응산물은 Sephadex G-10 컬럼을 사용하여 정제하였다. 즉, 2mg의 각각의 정제된 반응산물은 Bruker Avance II 900 MHz NMR spectrometer를 사용하여 ¹³C NMR, ¹H-¹³C HSQC NMR 및 ¹H-¹³C HMBC NMR 분석을 통해 화학구조를 규명하였으며 이때 사용한 내부 표준물질(internal standard)은 3-(트리메틸실릴)-프로피오닉-2,2,3,3,-d₄애시드(3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d₄acid)로 하였다.
- [68] 도 1A는 기질로 사용한 3,6-AHG이며, 도 1B는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나아제와의 효소 반응 결과 반응산물로 3,6-안하이드로갈락토닉산이 생성됨을 나타낸 것이다.
- [69] 도 2는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제의 반응산물의 NMR 분석 결과로, 1번 탄소와 1번 수소의 상관 스팟이 나타나지 않아 3,6-AHG의 알데히드기가 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제의 효소 반응에 의해 전환되었음을 알 수 있었고(도 2A), 3번 탄소와 6번 수소간의 상관(correlation)이 나타나는 것으로 보아 3,6-안하이드로 결합은 그대로 유지가 된 채로 1번 탄소의 스팟이 180 PPM 부근에서 나타났으므로, 3,6-AHG의 알데히드기가 카르복실기로 산화된 것을 볼 수 있었다(도 2B).
- [70] 따라서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제의 효소 반응 산물은 3,6-안하이드로갈락토닉산임을 알 수 있다.
- [71]
- [72] <실시에 2> 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소 재조합 미생물의

제조

- [73] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40, 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c, 비브리오속(*Vibrio*) EJY3 유래의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 클로닝하였다. 이를 위해, 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40, 슈도알테로모나스 아틀란티카(*Pseudoalteromonas atlantica*) T6c, 비브리오속(*Vibrio*) EJY3 유전체 서열로부터 얻어진 ACI 유전자 서열(유럽분자생물학연구소 (EMBL) 염기서열데이터베이스 식별번호: 각각 CP000282, 1152nt와 CP000388, 1137nt 그리고 CP003241, 1089nt)에 대한 정보를 기반으로 다음과 같은 프라이머 세트를 제작하였다.
- [74] 1) Sde
- [75] 정방향 프라이머 1: 5'- gaaggagatataaggatgaaaattcataacatgaaaaatttatcaa-3' (47mer: SEQ ID NO: 15)
- [76] 역방향 프라이머 2: 5'- atgatggtgatggtgtcattcagcaaaatacactgtcttc -3' (40mer: SEQ ID NO: 16)
- [77] 2) PatI
- [78] 정방향 프라이머 1: 5'- gaaggagatataaggatgatgagtgtcattaccaaactagaca-3' (43mer: SEQ ID NO: 17)
- [79] 역방향 프라이머 2: 5'- atgatggtgatggtgagaatgtttaactaaatagggaagaag-3' (42mer: SEQ ID NO: 18)
- [80] 3) Vejy3
- [81] 정방향 프라이머 1: 5'- gaaggagatataaggatgaaaacaacaatcaaagacatcaaaa-3' (43mer: SEQ ID NO: 19)
- [82] 역방향 프라이머 2: 5'- atgatggtgatggtgcacttcgtactgagcaattttgt-3' (38mer: SEQ ID NO: 20)
- [83] 각각 해당하는 유전체 DNA를 주형으로 PCR을 통해 각각의 유전자를 증폭하였다. 증폭된 *sdeACI*, *patIACI*, *vejy3ACI* DNA의 N-말단 부분은 모두 정제를 위해 6개의 히스티딘 잔기를 암호화하는 유전자 서열을 포함한 변형된 *pET21a* (이하 *pJL*) 벡터에 LIC (Ligation Independent Cloning) 방법을 사용하여 클로닝한 후, 발현용 대장균인 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환하였다. 이때 사용한 중합효소연쇄반응 조건은 다음과 같다. 1) 초기 변성 조건(Initial denaturation): 97°C, 30초, 2) 어닐링 조건: 35 사이클: 97°C, 10초 - 57°C, 1분 - 72°C, 2분, 3) 최종 연장 조건(final extension): 72°C, 5분.
- [84] *sdeACI*, *patIACI*, *vejy3ACI* 각각의 유전자가 포함된 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환한 대장균을 50mg/L의 엠피실린 항생제가 들어있는 Luria-bertani 배지에 접종하고 37°C에서 OD₆₀₀=0.5~1.0될 때까지 진탕배양하였다. 그 후에 0.5mM/L의 농도로 isopropyl-β-D-thiogalactopranoside(IPTG)를 사용하여 16°C에서 24시간 동안 발현을 유도하였다. 배양액을 4000rpm에서 15분 동안

원심분리하여 20mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액에 현탁한 균체를 초음파 파쇄기를 사용하여 균체로부터 조추출액을 만들었다. 조추출액은 4°C에서 15000rpm으로 40~60분 동안 원심분리하여 조효소액과 침전물로 분리하였다. 조효소액은 0.45 μ m 여과지로 여과한 후, 단계적으로 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 그리고 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 단백질을 정제하였다.

- [85] 10% SDS-PAGE 분석 결과, 대략 42 kDa 크기의 효소를 얻을 수 있다(미도시됨).
- [86] 정제한 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(vejy3ACI) 25 μ g을 상기 실시예 1에서 얻은 반응산물과 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응산물은 GC-TOF MS로 분석하고, 2차원 NMR 분석을 통해 화학 구조를 규명하였으며, Sephadex G-10 컬럼을 사용하여 정제를 하였다. 분석 및 정제방법은 상기 실시예 1과 동일하게 실시하였다. 표준물질로, 2-케토-3-데옥시-글루콘산(Sigma, Product no. 12271)을 사용하였다.
- [87] 도 1C에 나타난 바와 같이, 반응산물이 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산임을 확인하였다.
- [88] 도 3은 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(vejy3ACI)의 반응산물의 NMR 분석 결과로, 2-케토-3-데옥시-글루콘산(2-keto-3-deoxy-gluconic acid) 표준물질의 매스 스펙트럼과 도 1C의 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 효소 반응산물의 매스 스펙트럼이 일치하는 것으로 보아 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 효소 반응산물은 2-케토-3-데옥시-글루콘산과 같은 분자량과 2차원 구조를 갖고 있는 물질임을 알 수 있었다(도 3A). 또한, 1번 탄소의 카르복실기와 2번 탄소의 헤미케탈기(hemi-ketal structure)의 피크가 나타났고(도 3B), 1번 탄소와 6번 수소간의 상관 스팟(correlation spot)이 나타나지 않은 것으로 보아 1번 탄소의 카르복실기는 그대로 있음을 알 수 있다(도 3C). 또한 3번 탄소와 6번 탄소의 상관 스팟(correlation spot)이 나타나지 않은 것으로 보아 3,6-안하이드로 결합은 열린 것을 알 수 있으며, 2번 탄소와 6번 수소간의 상관 스팟이 나타났고(도 3D), 뿐만 아니라 3,6-안하이드로갈락토닉산에서 나타난 카르복실산(13 C 180 PPM) 시그널이 그대로 남아 있으므로 1번 탄소의 카르복실산은 그대로 유지되어 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 효소 반응산물은 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산임을 알 수 있었다.
- [89]
- [90] <실시예 3> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소의 재조합 미생물의 제조
- [91] 재조합 대장균의 성장 실험을 위해 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 유래 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소는 각각 또는 2개의 효소 코딩 유전자를 동시에 pBAD

벡터에 클로닝 하여 대장균(*E. coli*) K12 MG1655에 형질전환 시켰다. 이때 사용한 프라이머 정보는 다음과 같다:

- [92] 1. 효소 각각을 클로닝한 경우
- [93] 1.1. 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 코딩 유전자(ORF Names: VEJY3_09240)
- [94] 정방향 프라이머 1: 5'-gaaggagatataaggatgaaacgttaccaaagtacgttg-3'(SEQ ID NO: 13)
- [95] 역방향 프라이머 2: 5'-atgatggtgatgggtggcgaattcacatagaatgtcttc-3'(SEQ ID NO: 14)
- [96] 1.2. 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소 코딩 유전자(ORF Names: VEJY3_09370)
- [97] 정방향 프라이머 1: 5'-gcgctcgagatgaaaacaacaatcaaagacatcaaac-3'(Tm:61.9, *XhoI*) (SEQ ID NO: 21)
- [98] 역방향 프라이머 2: 5'-gcgtacgtacacttcgtactgagcaattttg-3'(Tm:61.8, *SnaBI*) (SEQ ID NO: 22)
- [99]
- [100] 2. 효소를 동시에 클로닝한 경우: 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 코딩 유전자(ORF Names: VEJY3_09240) 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소 코딩 유전자(ORF Names: VEJY3_09370)
- [101] 2.1. 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 코딩 유전자(VEJY3_09240)
- [102] 정방향 프라이머 1: 5'-gcgctcgagatgaaacgttaccaaagtacgttg-3'(*XhoI*) (SEQ ID NO: 23)
- [103] 역방향 프라이머 2: 5'-gcgtctagattagtcgaaattcacatagaatgtct-3'(*XbaI*) (SEQ ID NO: 24)
- [104] 2.2. 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소 코딩 유전자(VEJY3_09370)
- [105] 정방향 프라이머 1: 5'-gcgtctagaatgaaaacaacaatcaaagacatcaaac-3'(*XbaI*) (SEQ ID NO: 21)
- [106] 역방향 프라이머 2: 5'-gcgtacgtacacttcgtactgagcaattttg-3'(*SnaBI*) (SEQ ID NO: 22)
- [107] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 코딩 유전자(ORF Names: VEJY3_09240)와 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소 코딩 유전자(ORF Names: VEJY3_09370)를 동시에 pBAD에 클로닝 할 때에는 VEJY3_09240 프라이머 2의 *XbaI* 제한효소 자리와 VEJY3_09370 프라이머 1의 *XbaI* 제한효소자리가 라이게이션 반응 시 서로 연결되게 하였으며 연결된 VEJY3_09240와 VEJY3_09370 말단 자리의 *XhoI*와 *SnaBI* 제한효소 자리가 pBAD 벡터와 연결되도록 하였다.
- [108] pBAD 벡터에 클로닝 하여 대장균(*E. coli*) K12 MG1655에 형질전환 시킨

각각의 효소들은 0.01%(w/v)의 아라비노스를 사용하여 발현시켰다. 각각의 효소 코딩 유전자가 들어있는 대장균(*E. coli*) K12 MG1655 균주는 변형한 M9 배지에서 배양하였다. M9 배지의 제조 방법은 다음과 같다. 5배 농축된 M9 염 용액을 만들기 위해 2.5g의 NaCl, 5g의 NH₄Cl과 250mM의 Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)를 1L의 물에 녹인 후에 멸균시켰다. 200mL의 5배 농축된 M9 염 용액에 2mL의 1M MgSO₄, 0.1mL의 1M CaCl₂, 20mL의 20%(w/v) 3,6-AHG와 20mL의 5%(w/v) YNB(yeast nitrogen base)를 넣은 후 멸균수로 총 부피가 1L가 되도록 첨가해 주었다. 재조합 대장균(*E. coli*) K12 MG1655 의 배양 조건은 30°C, 200rpm이었다.

- [109] 탄소원으로 1%(w/v)의 3,6-AHG를 사용하고, 유도물질로 0.01%(w/v)의 아라비노스를 사용하여 상기 재조합 미생물을 배양한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 유전자가 없는 빈 벡터만 있는 조건에서는 재조합 대장균(*E. coli*) K12 MG1655가 전혀 성장하지 않았으며 각각의 효소 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제와 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 발현하는 재조합 대장균은 약간 성장하였으며 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 동시에 발현하는 재조합 대장균은 가장 높은 성장을 보였다.
- [110] 상기 재조합 미생물을 호기적인 조건에서 M9 배지에서 30°C에서 96시간 동안 배양한 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 탄소원으로 20mL의 20%(w/v) 3,6-AHG, 3,6-AHG와 갈락토오스가 주로 함유된 아가로스 가수분해물을 사용하였다. 이때, 탄소원으로 3,6-AHG, 3,6-AHG와 갈락토오스가 주로 함유된 아가로오스 가수분해물을 사용하였다.
- [111] 그 결과, AHG 탄소원에서 재조합 대장균 배양 시, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 유전자와 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소 유전자를 재조합한 조건에서만 성장하는 것을 확인하였다(도 5a). 또한 갈락토오스 조건에서는 빈 벡터(empty vector)와 2개의 효소유전자를 넣은 조건에서 비슷한 성장 곡선을 나타내었으며(도 5b), AHG와 갈락토오스가 주로 함유되어 있는 아가로스 가수분해물 탄소원 조건에서는 27시간까지는 비슷한 성장곡선을 나타내다가 그 이후로는 2개의 효소유전자를 넣은 조건에서 추가적인 성장을 나타내었다(도 5c).
- [112] 또한, 상기 재조합 미생물을 미세호기조건(microaerobic)에서 에탄올 발효 실험을 진행하였다. 상기 재조합 미생물을 발효시켜 생성된 에탄올은 에탄올 표준물질 농도별로 GC-FID 분석을 실시하여 검정곡선을 나타내었다. 배양액을 원심분리 한 후(16,000rpm, 4°C, 5분), 상층액을 얻어 분석하였으며 분석 조건은 다음과 같았다. 주입구(Inlet)의 온도 250°C, split ration 20:1, 압력 11.567 psi, 전체 흐름 24mL/min, septum purge 흐름 3mL/min이었으며, 샘플 시료는 1μl 주입하였다. 오븐의 흐름은 1mL/min, 오븐 온도 조건은 처음에 40°C에서 3.5분간

머무른 후에 50°C/min의 속도로 150°C까지 승온 시킨 후 1분간 머무름 시간을 주었다. 그 후 20°C/min의 속도로 180°C까지 승온 시킨 후 2분간 머무름 시간을 주었으며 총 분석시간은 10.2분이었다. FID의 온도는 300°C였으며 수소 가스 흐름 40mL/min, 공기 흐름 350mL/min, 헬륨가스 흐름 15mL/min이었다. 도 6의 검정 곡선 결과 $y=245.18x+12.24$ (y =피크 영역(peak area), x =에탄올 농도(ethanol concentration, g/L))의 수식을 얻을 수 있었으며 이를 바탕으로 에탄올 농도를 계산하였다.

- [113] 미세호기조건에서의 세포밀도는 빈 벡터와 두 개의 효소유전자를 넣은 조건에서 모두 비슷하게 나타났으며(도 7a), 기질소비량을 측정한 결과, 갈락토오스의 소비량은 비슷하게 나타났지만, 갈락토오스를 모두 소비한 24시간 이후부터는 두 개의 효소유전자를 넣은 조건에서 AHG를 소비하는 것으로 나타났다(도 7b). 에탄올 생산은 두 개의 효소유전자를 넣은 조건에서 빈 벡터 조건보다 높게 나타났으며, 42시간에서는 빈 벡터 조건 대비 2개의 효소유전자를 넣은 조건에서 24% 높은 에탄올 농도를 나타내었다.
- [114]
- [115] <실시에 4> 3,6-AHG 대사 관련 효소 군의 제조합 미생물의 제조
- [116] 3,6-AHG 대사에 관련된 효소, 즉, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제, 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소, 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 발효용 대장균(*E. coli*) KO11 FL 균주에 도입하였다. 이때 사용한 프라이머 정보는 다음과 같다:
- [117] 1) 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 코딩 유전자(VEJY3_09240)
- [118] 정방향 프라이머 1: 5'-gcgctcgagatgaaacgttaccaaatgtactgtg-3'(XhoI)(SEQ ID NO: 23)
- [119] 역방향 프라이머 2: 5'-gcgctctagattagtcgaaattccatagaatgtct-3'(XbaI)(SEQ ID NO: 24)
- [120] 2) 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소 코딩 유전자 + 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제 코딩 유전자 + 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소 코딩 유전자(각각 VEJY3_09380 + VEJY3_09375 + VEJY3_09370)
- [121] 정방향 프라이머 1: 5'-gcgctctagaatgagtttggaaataaaacaagatacg-3'(XbaI)(SEQ ID NO: 21)
- [122] 역방향 프라이머 2: 5'-gcgtagcta cacttcgtactgagcaattttgtc-3'(SnaBI)(SEQ ID NO: 22)
- [123] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제 코딩 유전자(ORF Names: VEJY3_09240)와 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소 코딩 유전자 + 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제 코딩 유전자 + 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소 코딩 유전자(각각 VEJY3_09380

+ VEJY3_09375 + VEJY3_09370)를 동시에 pBAD에 클로닝 할 때에는 VEJY3_09240 프라이머 2의 *Xba*I 제한효소 자리와 VEJY3_09380 + VEJY3_09375 + VEJY3_09370 프라이머 1의 *Xba*I 제한효소 자리가 라이게이션 반응 시에 서로 연결되게 하였으며 연결된 VEJY3_09240와 VEJY3_09380 + VEJY3_09375 + VEJY3_09370 말단 자리의 *Xho*I와 *Sna*I 제한효소 자리가 pBAD 벡터와 연결되도록 하였다. 재조합 대장균(*E. coli*) KO11 FL 균주의 효소 발현 및 배양 방법은 상기 실시예 1 및 2의 재조합 대장균(*E. coli*) K12 MG1655에서 사용한 방법과 동일하게 하였다. 이때 배지의 탄소원으로 1%의 갈락토오스 또는 1% 갈락토오스 + 1% 3,6-AHG를 사용하였다.

- [124] 상기 재조합 미생물을 배양하여 성장 실험을 실시하였다. 배지 조성은 상술한 변형한 M9 배지를 사용하였으며, 탄소원으로 탄소원을 넣지 않은 조건(대조군), 유도물질 없이 1%(w/v)의 3,6-AHG만 넣은 조건, 유도물질인 0.01%(w/v)의 아라비노스만 있는 조건, 그리고 1%(w/v)의 3,6-AHG에 0.01%(w/v)의 아라비노스를 넣은 조건에서 배양하였다.
- [125] 도 8에 나타난 바와 같이, 1%(w/v)의 3,6-AHG에 0.01%(w/v)의 아라비노스를 넣은 조건에서만 세포 밀도의 증가를 관찰하였다.
- [126] 상기 재조합 미생물을 아가로오스 분해산물인 갈락토오스와 3,6-AHG 혼합당 조건에서 발효를 실시하였다. 이때 배지의 탄소원으로는 1%(w/v)의 갈락토오스와 혼합당 (1%(w/v)의 갈락토오스 + 1%(w/v)의 3,6-AHG) 조건에서 발효를 시행하였으며 0.01%(w/v)의 아라비노스를 유도물질로 사용하였다.
- [127] 도 9에 나타난 바와 같이, 혼합당 조건에서 1%(w/v)의 갈락토오스만 넣어준 조건보다 세포밀도가 더 높게 나타났다.
- [128] 상기 재조합 미생물을 미세호기조건에서 상기 실시예 3의 방법과 동일하게 알코올 발효 실험을 진행하였다.
- [129] 도 10에 나타난 바와 같이, 혼합당 발효 시 4.11 g/L의 에탄올을 생산하였고, 갈락토오스 발효 시에는 1.93 g/L의 에탄올을 생산하였다.

산업상 이용가능성

- [130] 본 발명은 바이오에탄올 제조 분야에 사용할 수 있다.

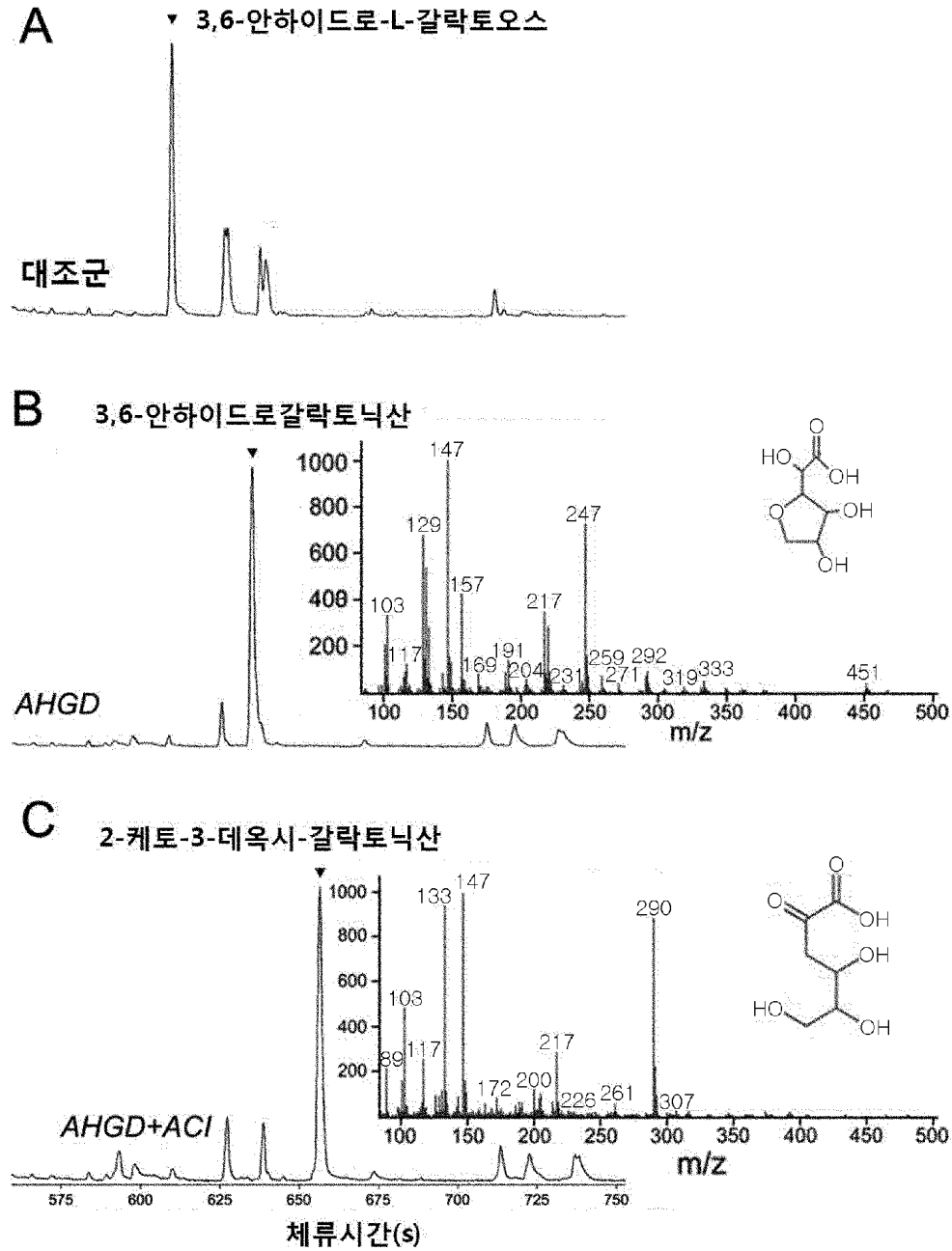
청구범위

- [청구항 1] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 코딩하는 유전자;
3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(3,6-anhydrogalactonic acid cycloisomerase)를 코딩하는 유전자;
2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소(2-keto-3-deoxy-galactonic acid kinase)를 코딩하는 유전자; 및
2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제(2-keto-3-deoxy-phosphogalactonic acid aldolase)를 코딩하는 유전자를 포함하는 에탄올 제조용 재조합 벡터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 1의 염기서열로 표시되는 에탄올 제조용 재조합 벡터.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NOS: 3, 5 또는 7의 염기서열 중 어느 하나로 표시되는 에탄올 제조용 재조합 벡터.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 9의 염기서열로 표시되는 에탄올 제조용 재조합 벡터.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 코딩하는 유전자는 SEQ ID NO: 11의 염기서열로 표시되는 에탄올 제조용 재조합 벡터.
- [청구항 6] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제(3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase)를 코딩하는 유전자;
3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소(3,6-anhydrogalactonic acid cycloisomerase)를 코딩하는 유전자;
2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소(2-keto-3-deoxy-galactonic acid kinase)를 코딩하는 유전자; 및
2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제(2-keto-3-deoxy-phosphogalactonic acid aldolase)를

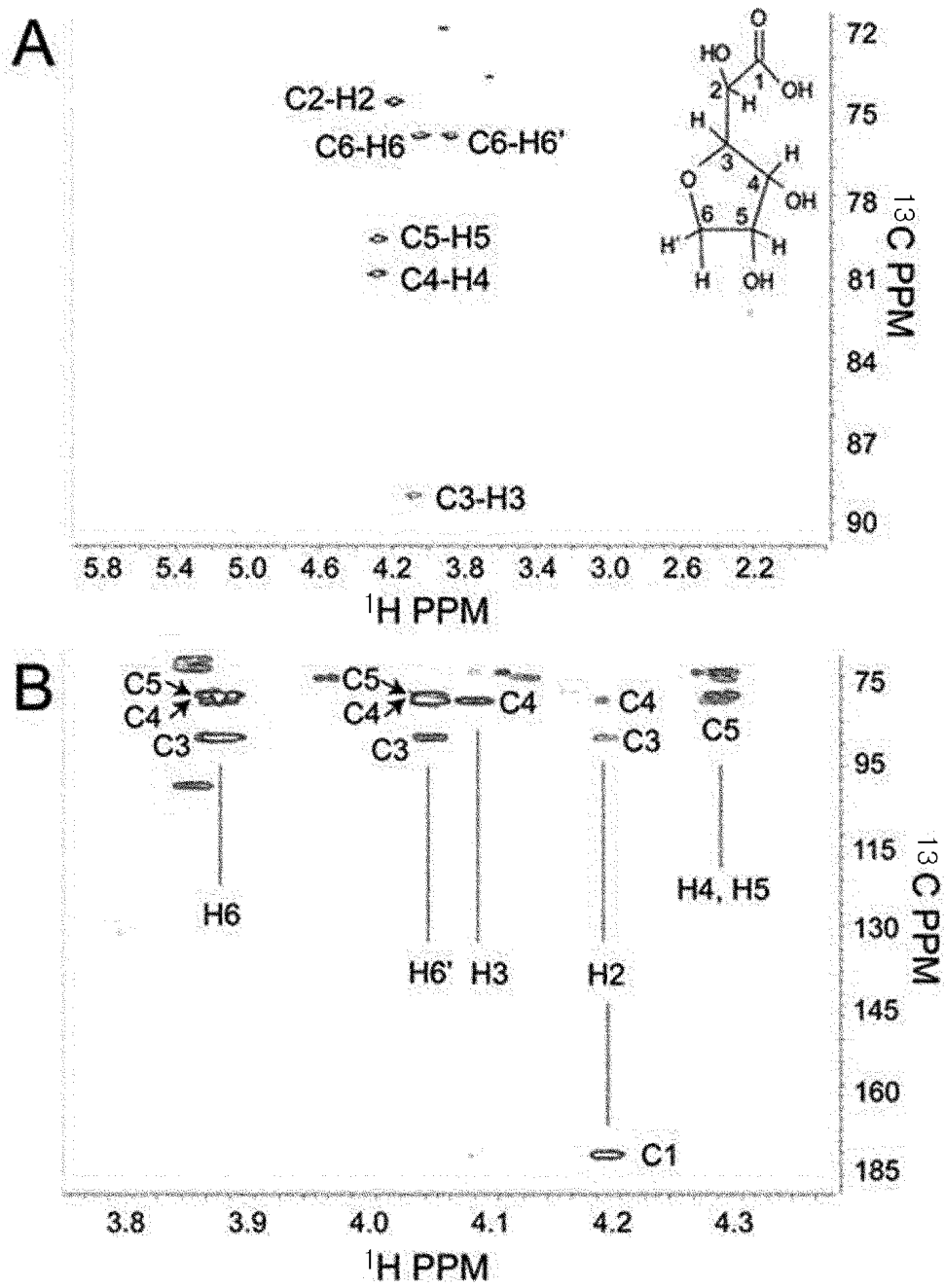
- [청구항 7] 코딩하는 유전자로 형질전환된 에탄올 제조용 재조합 미생물. 제6항에 있어서,
 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터;
 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터;
 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및
 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 에탄올 제조용 재조합 미생물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 코딩하는 유전자 및 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터;
 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터; 및
 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 에탄올 제조용 재조합 미생물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,
 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제를 코딩하는 유전자, 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소를 코딩하는 유전자, 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소를 코딩하는 유전자 및 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 에탄올 제조용 재조합 미생물.
- [청구항 10] 제6항에 있어서,
 재조합 미생물은 발효 균주인 에탄올 제조용 재조합 미생물.
- [청구항 11] 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물을 탄소원으로 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 사용하여 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의 제조방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
 발효 시 유도물질로 아라비노스를 첨가하는 에탄올의 제조방법.
- [청구항 13] 제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 재조합 미생물의 배양액 또는 균주 추출액을 갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 이루어진 균으로부터 선택된

하나 이상의 기질과 반응시켜 피루브산을 제조하는 단계; 및
상기 피루브산을 알코올 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의
제조방법.

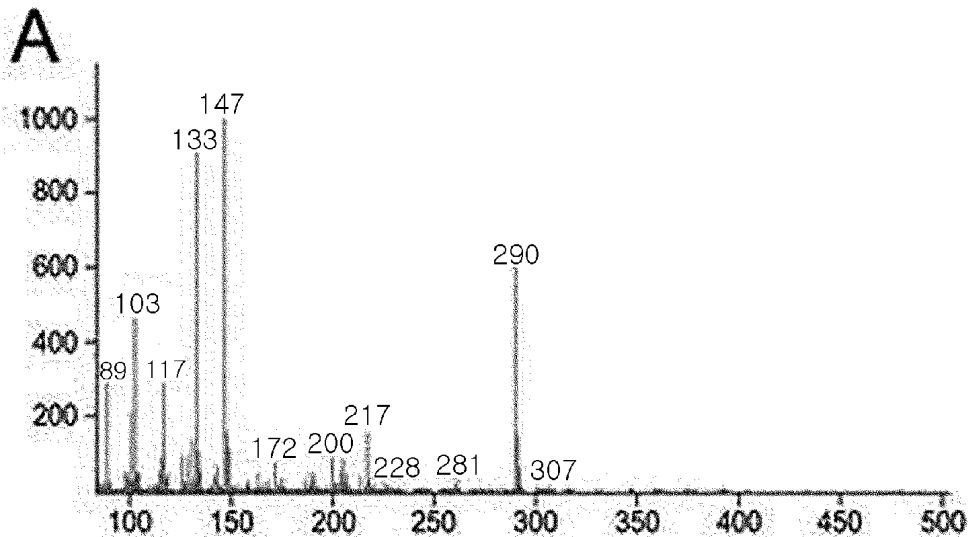
[Fig. 1]



[Fig. 2]

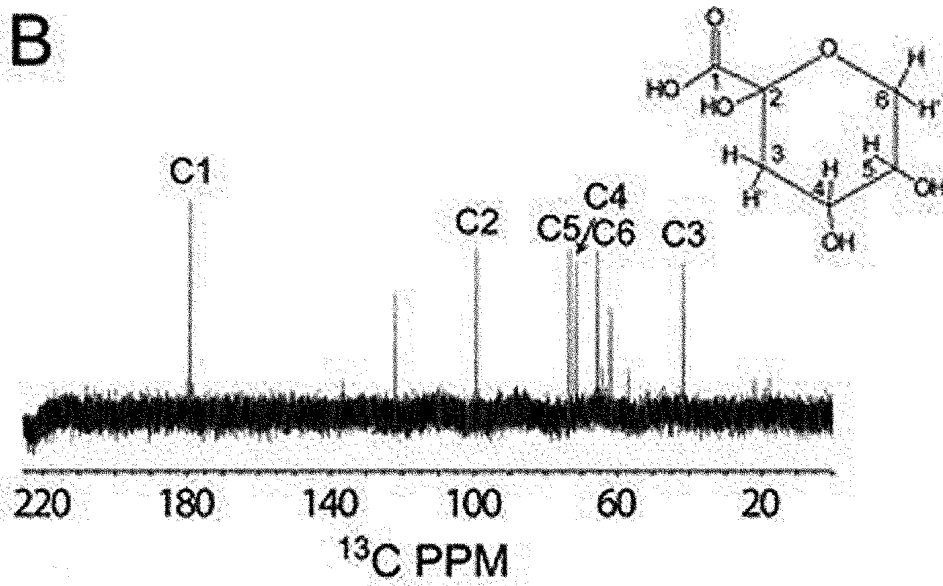


[Fig. 3a]



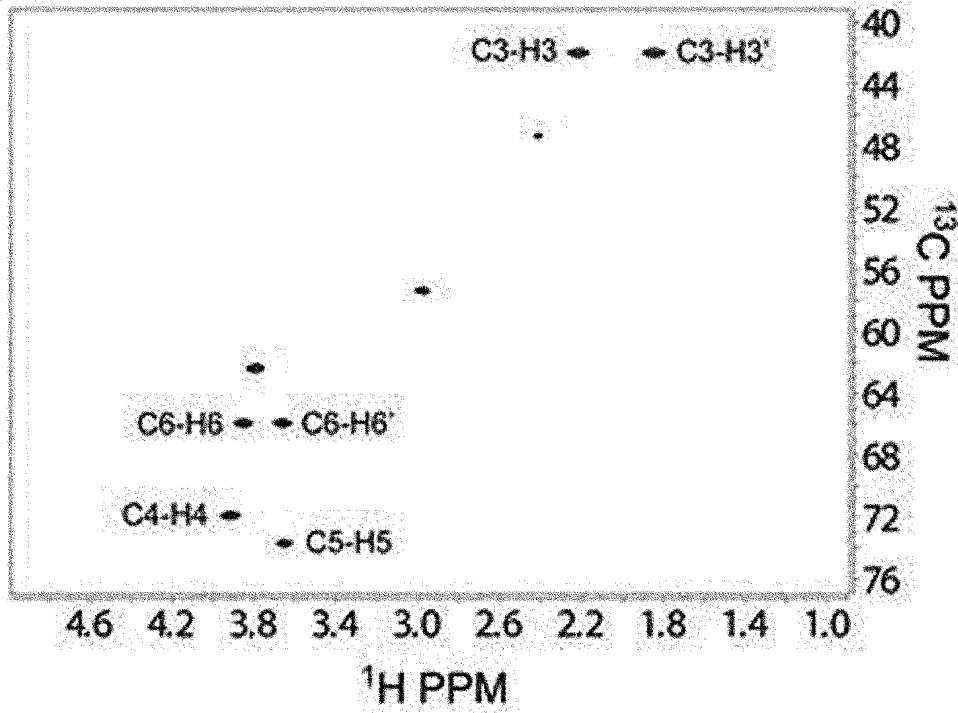
[Fig. 3b]

B

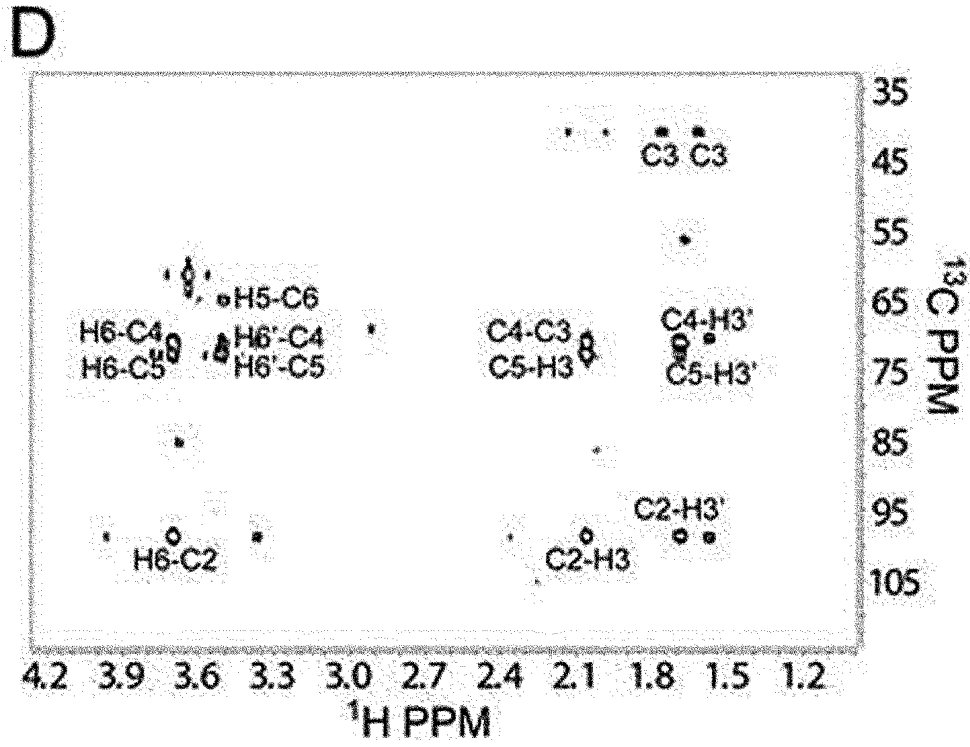


[Fig. 3c]

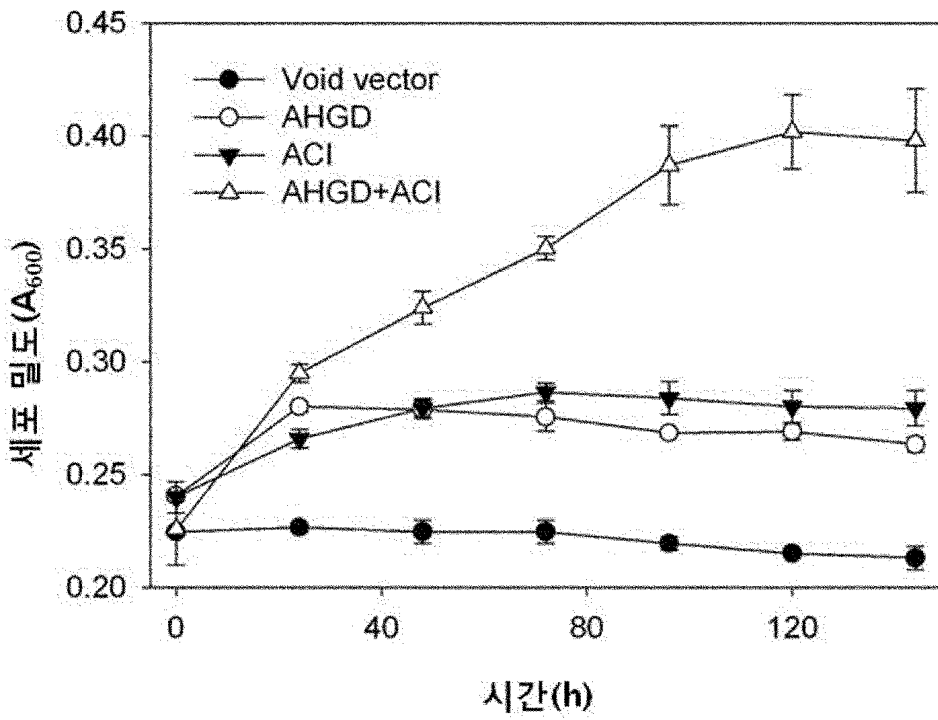
C



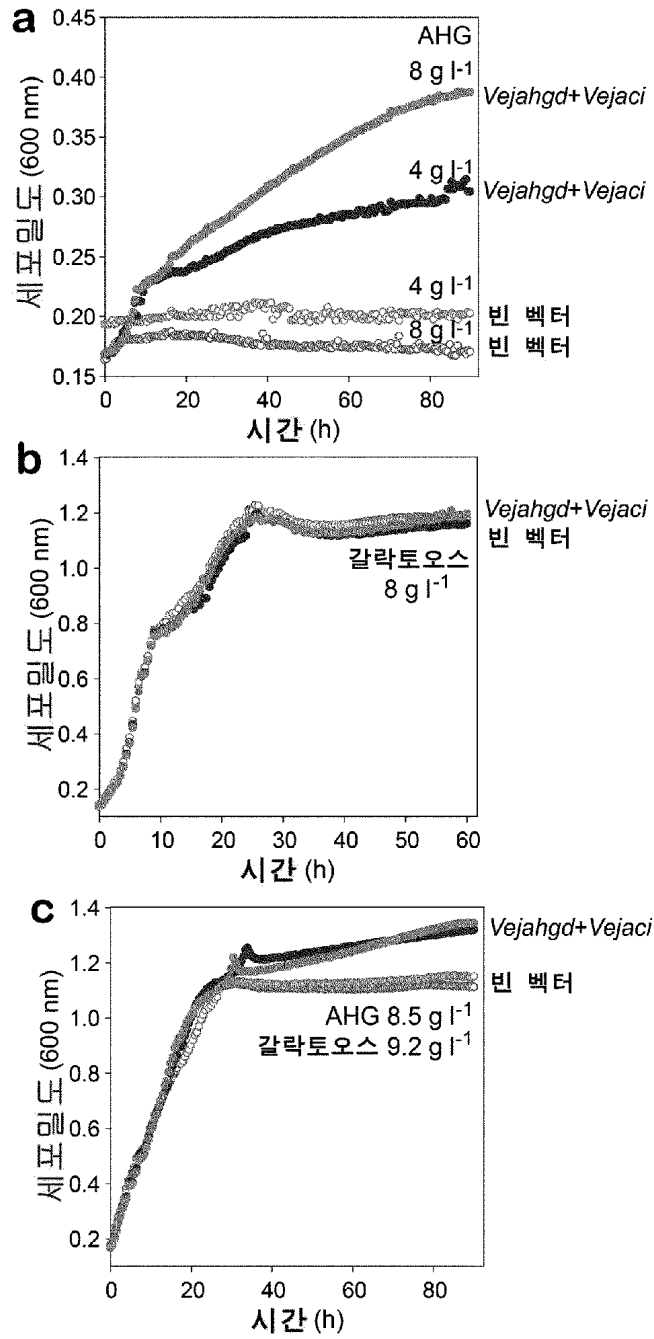
[Fig. 3d]



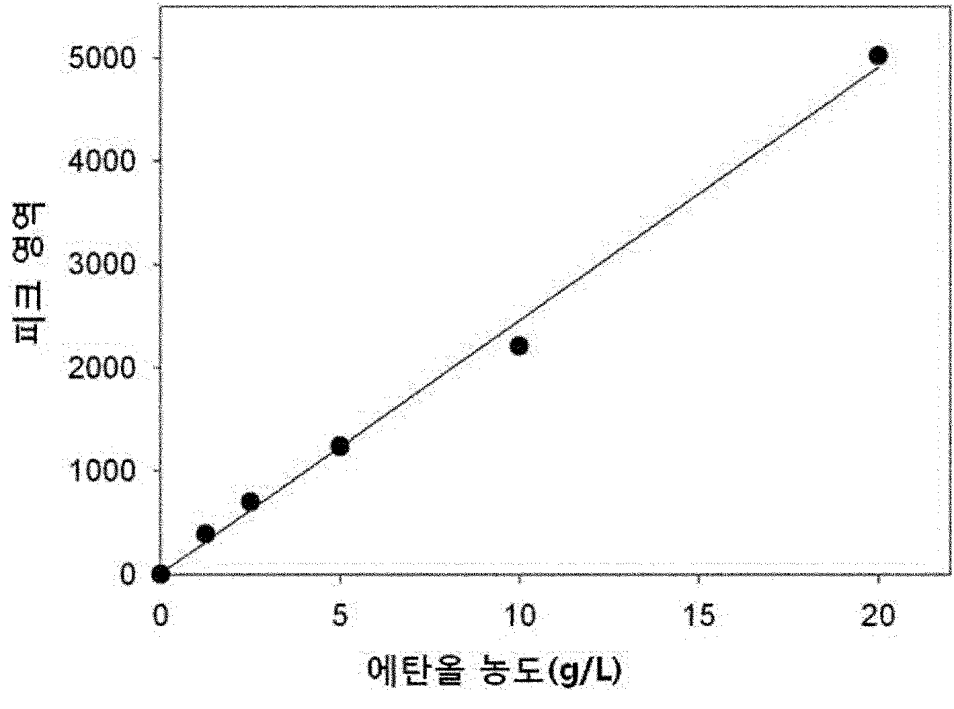
[Fig. 4]



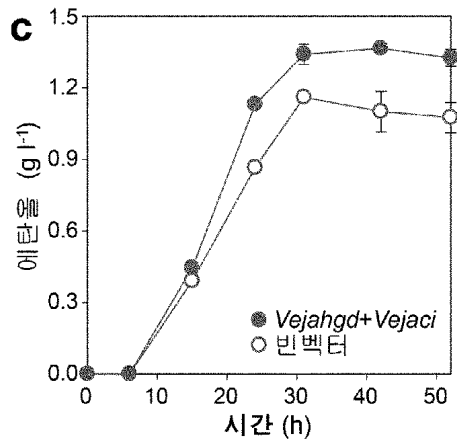
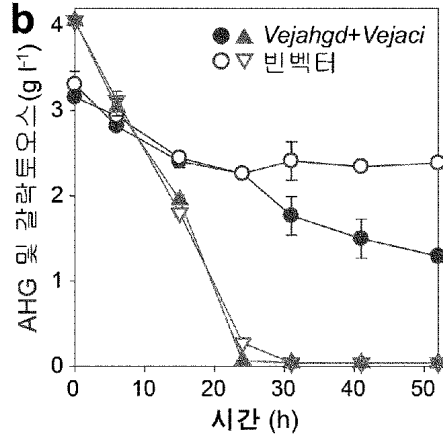
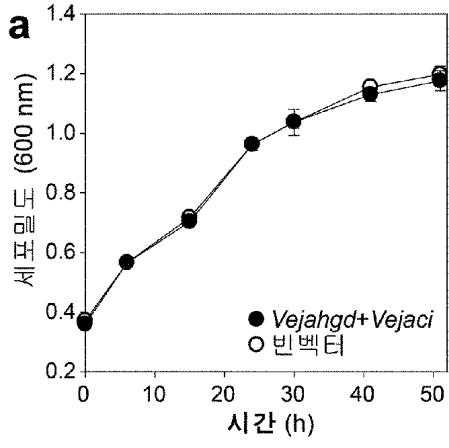
[Fig. 5]



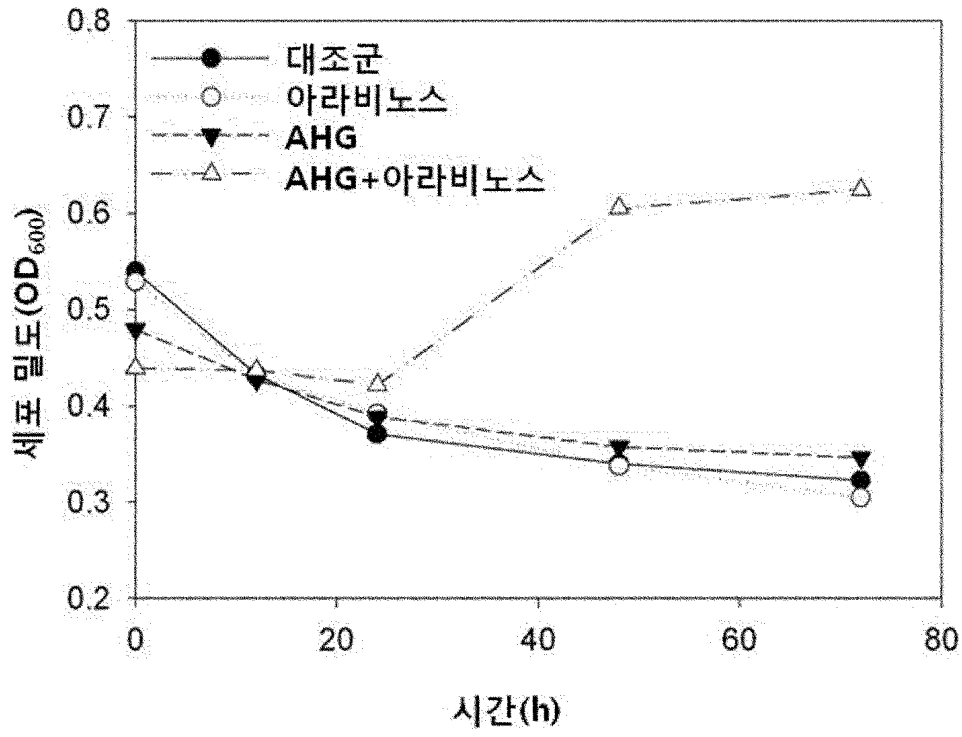
[Fig. 6]



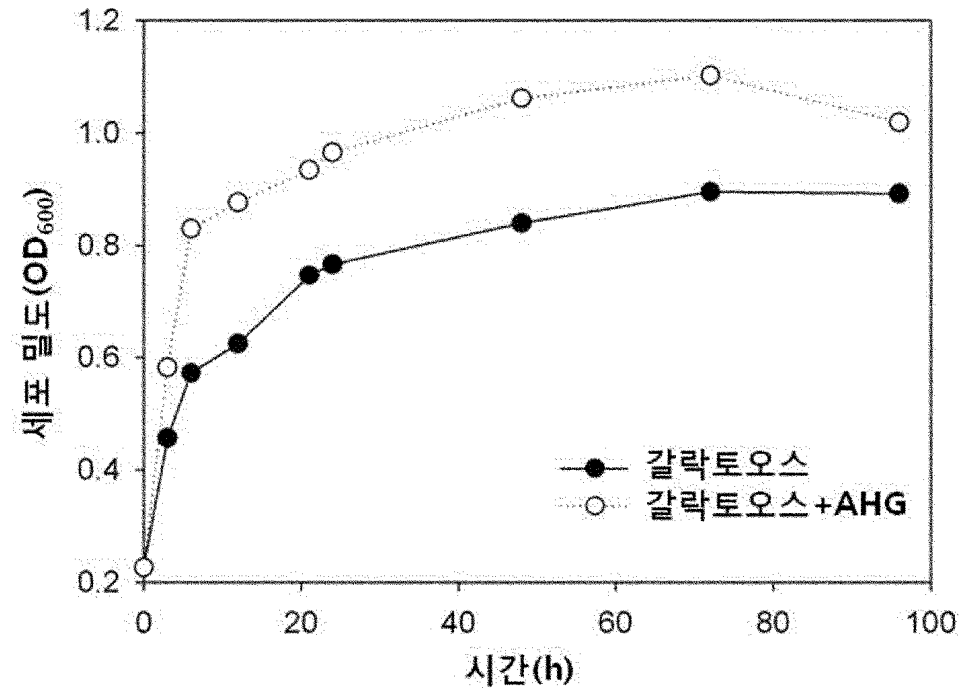
[Fig. 7]



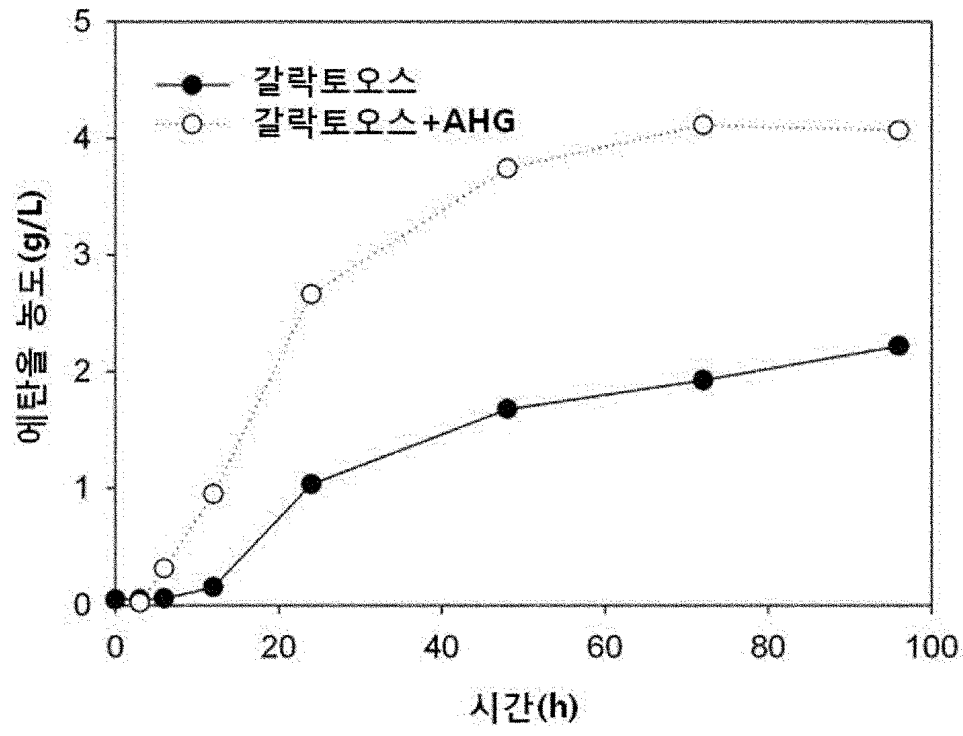
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i, C12P 7/06(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 15/63; A61K 914; C12P 7/16; C12N 1/13; C12N 1/00; C12N 9/02; C12N 15/53; C12P 7/06; C12N 15/52; C12N 1/21

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: ethanol, 3,6-anhydro-L-galactose dehydrogenase, 3,6-anhydrogalactonic acid cyclisomerase, 2-keto-3-deoxy-galactonic acid kinase, 2-keto-3-deoxy-phosphogalactonic acid aldolase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012-0149092 A1 (GREEN, Brian et al.) 14 June 2012 See the entire document	1-13
A	US 2011-0312052 A1 (KOLTERMANN, Andre et al.) 22 December 2011 See the entire document	1-13
A	KR 10-2012-0085364 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 01 August 2012 See the entire document	1-13
A	US 2011-0008861 A1 (BERRY, David A. et al.) 13 January 2011 See the entire document	1-13
A	US 6395299 B1 (BABICH, John W. et al.) 28 May 2002 See the entire document	1-13



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

03 JULY 2014 (03.07.2014)

Date of mailing of the international search report

04 JULY 2014 (04.07.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2012-0149092 A1	14/06/2012	CA 2728285 A1	11/09/2009
		CA 2740400 A1	22/04/2010
		CN 102015995 A	13/04/2011
		CN 102216463 A	12/10/2011
		CN 102216463 B	16/10/2013
		EP 2285948 A1	23/02/2011
		EP 2285948 A4	29/02/2012
		EP 2285948 B1	08/01/2014
		EP 2344652 A1	20/07/2011
		EP 2344652 A4	21/03/2012
		EP 2706111 A1	12/03/2014
		IL 207951 D0	30/12/2010
		IL 212363 D0	30/06/2011
		MX 2011004049 A	27/09/2011
		US 2011-008861 A1	13/01/2011
		US 2011-151531 A1	23/06/2011
		US 2011-262975 A1	27/10/2011
		US 2011-281335 A1	17/11/2011
		US 2012-015427 A1	19/01/2012
		US 2012-122193 A1	17/05/2012
		US 2013-252300 A1	26/09/2013
		US 7968321 B1	28/06/2011
		US 7981647 B2	19/07/2011
		US 8048666 B1	01/11/2011
		US 8216816 B2	10/07/2012
		US 8227237 B2	24/07/2012
		US 8465954 B2	18/06/2013
		WO 2009-111513 A1	11/09/2009
		WO 2010-006312 A2	14/01/2010
		WO 2010-006312 A3	27/05/2010
		WO 2010-017245 A1	11/02/2010
		WO 2010-017245 A8	14/10/2010
		WO 2010-036951 A2	01/04/2010
WO 2010-036951 A3	24/06/2010		
WO 2010-044960 A1	22/04/2010		
US 2011-0312052 A1	22/12/2011	CA 2746861 A1	08/07/2010
		CN 102272314 A	07/12/2011
		DK 2204453 T3	10/06/2013
		EP 2204453 A1	07/07/2010
		EP 2204453 B1	13/03/2013
		JP 05-461582 B2	02/04/2014
		JP 2012-513759 A	21/06/2012
		KR 10-1328382 B1	13/11/2013
		KR 10-2011-0101221 A	15/09/2011
		MX 2011006745 A	17/10/2011
		WO 2010-076305 A1	08/07/2010
KR 10-2012-0085364 A	01/08/2012	US 2013-0303743 A1	14/11/2013

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2012-102552 A2	02/08/2012
		WO 2012-102552 A3	13/06/2013
US 2011-0008861 A1	13/01/2011	AU 2008-323673 A1	14/05/2009
		CA 2704227 A1	14/05/2009
		CA 2728285 A1	11/09/2009
		CA 2740400 A1	22/04/2010
		CN 102015995 A	13/04/2011
		CN 102216463 A	12/10/2011
		CN 102216463 B	16/10/2013
		EP 2217695 A2	18/08/2010
		EP 2285948 A1	23/02/2011
		EP 2285948 A4	29/02/2012
		EP 2285948 B1	08/01/2014
		EP 2327769 A1	01/06/2011
		EP 2327769 B1	27/03/2013
		EP 2344652 A1	20/07/2011
		EP 2344652 A4	21/03/2012
		EP 2615164 A1	17/07/2013
		EP 2706111 A1	12/03/2014
		IL 207951 D0	30/12/2010
		IL 212363 D0	30/06/2011
		JP 2011-516029 A	26/05/2011
		MX 2011004049 A	27/09/2011
		US 2009-0191599 A1	30/07/2009
		US 2009-0203070 A1	13/08/2009
		US 2011-0124073 A1	26/05/2011
		US 2011-0151531 A1	23/06/2011
		US 2011-262975 A1	27/10/2011
		US 2011-281335 A1	17/11/2011
		US 2012-015427 A1	19/01/2012
		US 2012-122193 A1	17/05/2012
		US 2012-149092 A1	14/06/2012
		US 2013-252300 A1	26/09/2013
		US 7785861 B2	31/08/2010
		US 7968321 B1	28/06/2011
		US 7981647 B2	19/07/2011
		US 8048666 B1	01/11/2011
		US 8216816 B2	10/07/2012
		US 8227237 B2	24/07/2012
		US 8465954 B2	18/06/2013
		WO 2009-036095 A1	19/03/2009
		WO 2009-036095 A8	19/03/2009
		WO 2009-062190 A2	14/05/2009
		WO 2009-062190 A3	17/09/2009
		WO 2009-111513 A1	11/09/2009
		WO 2010-006312 A2	14/01/2010
		WO 2010-006312 A3	27/05/2010
		WO 2010-017245 A1	11/02/2010
		WO 2010-017245 A8	11/02/2010

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 2010-017245 A8	14/10/2010
		WO 2010-036951 A2	01/04/2010
		WO 2010-036951 A3	24/06/2010
		WO 2010-044960 A1	22/04/2010
US 6395299 B1	28/05/2002	AU 2759900 A	29/08/2000
		AU 772153 B2	08/04/2004
		CA 2328614 A1	17/08/2000
		CA 2328614 C	26/06/2012
		IL 138990 D0	25/11/2001
		JP 2002-536422 A	29/10/2002
		JP 2002-536422 T	29/10/2002
		JP 4812167 B2	09/11/2011
		US 2003-0082238 A1	01/05/2003
		US 2004-0241205 A1	02/12/2004
		US 2007-0098807 A1	03/05/2007
		US 7052913 B2	30/05/2006
		WO 00-47236 A1	17/08/2000
		WO 00-47236 A8	19/04/2001

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i, C12N 1/21(2006.01)i, C12P 7/06(2006.01)j

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/63; A61K 914; C12P 7/16; C12N 1/13; C12N 1/00; C12N 9/02; C12N 15/53; C12P 7/06; C12N 15/52; C12N 1/21

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: 에탄올, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 디하이드로게나제, 3,6-안하이드로갈락토닉산 시클로이성질화효소, 2-케토-3-데옥시-갈락토닉산 인산화효소, 2-케토-3-데옥시-포스포갈락토닉산 알돌라아제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2012-0149092 A1 (BRIAN GREEN 등) 2012.06.14 전체 문헌 참조	1-13
A	US 2011-0312052 A1 (ANDRE KOLTERMANN 등) 2011.12.22 전체 문헌 참조	1-13
A	KR 10-2012-0085364 A (고려대학교 산학협력단) 2012.08.01 전체 문헌 참조	1-13
A	US 2011-0008861 A1 (DAVID A. BERRY 등) 2011.01.13 전체 문헌 참조	1-13
A	US 6395299 B1 (JOHN W. BABICH 등) 2002.05.28 전체 문헌 참조	1-13

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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 07월 03일 (03.07.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 07월 04일 (04.07.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

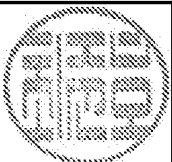
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최준호

전화번호 +82-42-481-5569



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0149092 A1	2012/06/14	CA 2728285 A1 CA 2740400 A1 CN 102015995 A CN 102216463 A CN 102216463 B EP 2285948 A1 EP 2285948 A4 EP 2285948 B1 EP 2344652 A1 EP 2344652 A4 EP 2706111 A1 IL 207951 D0 IL 212363 D0 MX 2011004049 A US 2011-008861 A1 US 2011-151531 A1 US 2011-262975 A1 US 2011-281335 A1 US 2012-015427 A1 US 2012-122193 A1 US 2013-252300 A1 US 7968321 B1 US 7981647 B2 US 8048666 B1 US 8216816 B2 US 8227237 B2 US 8465954 B2 WO 2009-111513 A1 WO 2010-006312 A2 WO 2010-006312 A3 WO 2010-017245 A1 WO 2010-017245 A8 WO 2010-036951 A2 WO 2010-036951 A3 WO 2010-044960 A1	2009/09/11 2010/04/22 2011/04/13 2011/10/12 2013/10/16 2011/02/23 2012/02/29 2014/01/08 2011/07/20 2012/03/21 2014/03/12 2010/12/30 2011/06/30 2011/09/27 2011/01/13 2011/06/23 2011/10/27 2011/11/17 2012/01/19 2012/05/17 2013/09/26 2011/06/28 2011/07/19 2011/11/01 2012/07/10 2012/07/24 2013/06/18 2009/09/11 2010/01/14 2010/05/27 2010/02/11 2010/10/14 2010/04/01 2010/06/24 2010/04/22
US 2011-0312052 A1	2011/12/22	CA 2746861 A1 CN 102272314 A DK 2204453 T3 EP 2204453 A1 EP 2204453 B1 JP 05-461582 B2 JP 2012-513759 A KR 10-1328382 B1 KR 10-2011-0101221 A MX 2011006745 A WO 2010-076305 A1	2010/07/08 2011/12/07 2013/06/10 2010/07/07 2013/03/13 2014/04/02 2012/06/21 2013/11/13 2011/09/15 2011/10/17 2010/07/08
KR 10-2012-0085364 A	2012/08/01	US 2013-0303743 A1	2013/11/14

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2012-102552 A2	2012/08/02
		WO 2012-102552 A3	2013/06/13
US 2011-0008861 A1	2011/01/13	AU 2008-323673 A1	2009/05/14
		CA 2704227 A1	2009/05/14
		CA 2728285 A1	2009/09/11
		CA 2740400 A1	2010/04/22
		CN 102015995 A	2011/04/13
		CN 102216463 A	2011/10/12
		CN 102216463 B	2013/10/16
		EP 2217695 A2	2010/08/18
		EP 2285948 A1	2011/02/23
		EP 2285948 A4	2012/02/29
		EP 2285948 B1	2014/01/08
		EP 2327769 A1	2011/06/01
		EP 2327769 B1	2013/03/27
		EP 2344652 A1	2011/07/20
		EP 2344652 A4	2012/03/21
		EP 2615164 A1	2013/07/17
		EP 2706111 A1	2014/03/12
		IL 207951 D0	2010/12/30
		IL 212363 D0	2011/06/30
		JP 2011-516029 A	2011/05/26
		MX 2011004049 A	2011/09/27
		US 2009-0191599 A1	2009/07/30
		US 2009-0203070 A1	2009/08/13
		US 2011-0124073 A1	2011/05/26
		US 2011-0151531 A1	2011/06/23
		US 2011-262975 A1	2011/10/27
		US 2011-281335 A1	2011/11/17
		US 2012-015427 A1	2012/01/19
		US 2012-122193 A1	2012/05/17
		US 2012-149092 A1	2012/06/14
		US 2013-252300 A1	2013/09/26
		US 7785861 B2	2010/08/31
		US 7968321 B1	2011/06/28
		US 7981647 B2	2011/07/19
		US 8048666 B1	2011/11/01
		US 8216816 B2	2012/07/10
		US 8227237 B2	2012/07/24
		US 8465954 B2	2013/06/18
		WO 2009-036095 A1	2009/03/19
		WO 2009-036095 A8	2009/03/19
		WO 2009-062190 A2	2009/05/14
		WO 2009-062190 A3	2009/09/17
		WO 2009-111513 A1	2009/09/11
		WO 2010-006312 A2	2010/01/14
		WO 2010-006312 A3	2010/05/27
		WO 2010-017245 A1	2010/02/11
		WO 2010-017245 A8	2010/02/11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2010-017245 A8	2010/10/14
		WO 2010-036951 A2	2010/04/01
		WO 2010-036951 A3	2010/06/24
		WO 2010-044960 A1	2010/04/22
US 6395299 B1	2002/05/28	AU 2759900 A	2000/08/29
		AU 772153 B2	2004/04/08
		CA 2328614 A1	2000/08/17
		CA 2328614 C	2012/06/26
		IL 138990 D0	2001/11/25
		JP 2002-536422 A	2002/10/29
		JP 2002-536422 T	2002/10/29
		JP 4812167 B2	2011/11/09
		US 2003-0082238 A1	2003/05/01
		US 2004-0241205 A1	2004/12/02
		US 2007-0098807 A1	2007/05/03
		US 7052913 B2	2006/05/30
		WO 00-47236 A1	2000/08/17
		WO 00-47236 A8	2001/04/19