(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 1 월 4 일 (04.01.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/004308 A2

(51) 국제특허분류:
C12N 9/90 (2006.01) *C12P 19/02* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) *C12P 19/24* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/006985

(22) 국제출원일: 2017 년 6 월 30 일 (30.06.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0082543 2016 년 6 월 30 일 (30.06.2016) KR

(71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) **(CJ CHEILJEDANG CORPORATION)** [KR/KR]; 04560 서울시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(72) 발명자: **양성재 (YANG, Sungjae)**; 16688 경기도 수원시 영통구 태장로 45 205동 1504호, Gyeonggi-do (KR). **조현국 (CHO, Hyun Kug)**; 06065 서울시 강남구 선릉로 748 201동 410호, Seoul (KR). **이영미 (LEE, Young Mi)**; 16516 경기도 수원시 영통구 광교호수공원로 45 1007동 2105호, Gyeonggi-do (KR). **김성보 (KIM, Seong Bo)**; 13567 경기도 성남시 분당구 양현로 138 810동 602호, Gyeonggi-do (KR). **조성준 (CHO, Seong Jun)**; 04971 서울시 광진구 아차산로 552 2동 706호, Seoul (KR).

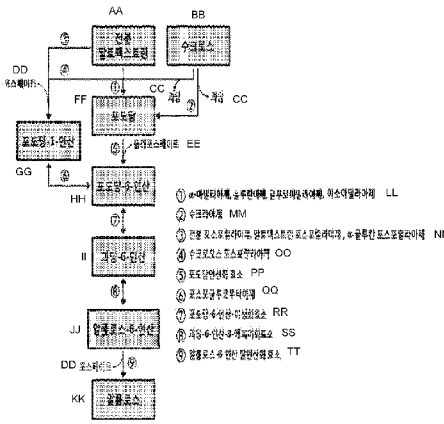
(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 06302 서울시 강남구 양재천로163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

(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, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, 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).

(54) **Title:** NOVEL HEAT-RESISTANT FRUCTOSE-6-PHOSPHATE-3-EPIM ERASE AND METHOD FOR PRODUCING AL-LULOSE BY USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 신규 내열성 과당-6-인산-3-에피머화 효소 및 이를 이용한 알룰로스 제조방법



AA ... Starch maltodextrin
BB ... Sucrose
CC ... Fructose
DD ... Phosphate
EE ... Polyphosphate
FF ... Glucose
GG ... Glucose-1-phosphate
HH ... Glucose-6-phosphate
II ... Fructose-6-phosphate
JJ ... Allulose-6-phosphate
KK ... Allulose
LL ... α-Amylase, pluranase, glucoamylase, isoamylase
MM ... Sucrase
NN ... Starch phosphorylase, maltodextrin phosphorylase, α-glucan phosphorylase
OO ... Sucrose phosphorylase
PP ... Glucokinase
QQ ... Phosphoglucomutase
RR ... Glucose-6-phosphate isomerase
SS ... Fructose-6-phosphate-3-epimerase
TT ... Allulose-6-phosphate phosphatase

(57) **Abstract:** The present application relates to a fructose-6-phosphate-3-epimerase including the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, a nucleic acid encoding the fructose-6-phosphate-3-epimerase, and a transformant containing the nucleic acid. Also, the present application relates to a composition comprising the fructose-6-phosphate-3-epimerase of the present application for producing allulose, and a method for producing allulose by using the fructose-6-phosphate-3-epimerase of the present application.

(57) **요약서:** 본 출원은 서열번호 1 의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소 (fructose-6-phosphate-3-epimerase), 상기 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 암호화하는 핵산 및 상기 핵산을 포함하는 형질전환체에 관한 것이다. 또한, 본 출원은 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 포함하는 알룰로스(allulose) 생산용 조성물 및 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 이용한 알룰로스 제조방법에 관한 것이다.

WO 2018/004308 A2

[다음 쪽 계속]

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 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: 신규 내열성 과당-6-인산-3-에피머화 효소 및 이를 이용한 알룰로스 제조방법

기술분야

[1] 본 출원은 과당-6-인산-3-에피머화 효소 및 이를 이용한 알룰로스 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 싸이코스-3-에피머화 효소(D-psicose-3-epimerase, EC 5.1.3.30) 및 타가토스-3-에피머화 효소(D-tagatose-3-epimerase, EC 5.1.3.31)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.

[4] 한편, Chan 등(2008. Biochemistry. 47:9608-9617)은 과당-6-인산(D-fructose-6-phosphate) 및 알룰로스-6-인산(D-allulose-6-phosphate)에 대해서 3-에피머화 반응을 수행할 수 있는 *Streptococcus* pyogenes 유래의 리블로스-5-인산-3-에피머화 효소(D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase, EC 5.1.3.1) 및 *E.* coli 유래의 알룰로스-6-인산-3-에피머화 효소(D-allulose 6-phosphate-3-epimerase, EC 5.1.3.-)를 보고한 바 있으나, 상기 효소들은 내열성을 갖지 못하여 산업적으로 이용이 불가능한 문제점이 있다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명자들은 경제적이면서 산업적으로 알룰로스로의 전환율을 높일 수 있는 방법을 개발하기 위해 예의 노력하였다. 그 결과, 경제적 원료인 수크로스, 전분 또는 말토덱스트린으로부터 포도당(glucose) 또는 포도당-1-인산(glucose-1-phosphate), 포도당-6-인산(glucose-6-phosphate) 및 과당-6-인산으로의 전환을 거쳐 알룰로스-6-인산을 생산하는 경우, 이후 비가역 반응경로를 수행하는 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소(allulose-6-phosphate phosphatase)를 이용하여 알룰로스를 생산할 수 있어, 알룰로스 생산 경로에 관여하는 복수의 효소를 동시에 사용 가능한 동시효소반응(one-pot enzymatic

conversions)으로 알룰로스를 생산할 수 있고, 알룰로스로의 전환율을 현저히 높일 수 있음에 착안하여, 상기 과당-6-인산을 알룰로스-6-인산으로 전환하는 경로에 적용할 수 있는 신규한 내열성 효소를 발굴함으로써 본 출원을 완성하였다.

[7]

과제 해결 수단

[8] 본 출원의 하나의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소(fructose-6-phosphate-3-epimerase)를 제공하는 것이다.

[9] 본 출원의 다른 목적은 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 암호화하는 핵산을 제공하는 것이다.

[10] 본 출원의 또 다른 목적은 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 암호화하는 핵산을 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.

[11] 본 출원의 또 다른 목적은 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 알룰로스(allulose) 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 출원의 또 다른 목적은 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 이용한 알룰로스 제조방법을 제공하는 것이다.

[13]

발명의 효과

[14] 본 출원의 내열성 과당-6-인산-3-에피머화 효소는 내열성이 있어 과당-6-인산을 알룰로스-6-인산으로 전환하는 경로를 산업적으로 수행할 수 있고, 경제적인 원료를 사용하여 알룰로스 합성 경로의 진행을 가능하게 하며, 비가역 반응 경로인 알룰로스-6-인산 탈인산화 반응에 의하여 알룰로스 생산을 가능하게 하는바, 알룰로스로의 전환율을 현저히 높일 수 있다.

[15] 또한, 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 이용한 알룰로스 제조방법은 알룰로스로의 전환율 상승에 의하여 반응 결과물이 고농도의 알룰로스를 포함하여 분리정제 공정을 단순화 또는 제거할 수 있는바, 제조 방법이 간단하면서도 경제적인 이점이 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 전분(예컨대, 말토덱스트린), 수크로스 또는 포도당으로부터 알룰로스를 제조할 수 있는 반응 경로를 나타낸 것이다.

[18] 도 2는 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소(E: FP3E)의 분자량을 단백질 전기영동(SDS-PAGE)으로 분석한 결과를 나타낸다.다. M은 단백질 크기 측정 마커(size marker)이다.

[19] 도 3은 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소의 과당-6-인산에서

알룰로스-6-인산으로의 전환 활성을 확인한 것이다.

[20] 도 4는 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소의 완충용액 및 pH 범위에 따른 활성을 확인한 것이다.

[21] 도 5는 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소의 온도에 따른 활성을 확인한 것이다.

[22] 도 6은 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소의 금속 이온 첨가에 따른 활성을 확인한 것이다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 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.

[25]

[26] 본 출원의 목적을 달성하기 위하여, 본 출원은 하나의 양태로서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소(fructose-6-phosphate-3-epimerase)를 제공한다.

[27]

[28] 또한, 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 상동성을 가지며, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가지더라도 본 출원의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[29] 또한, 본 출원의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소와 상응하는 활성을 가지는 단백질이라면 서열번호 1의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이(silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질 또한 본 출원의 범위 내에 속한다.

[30] 나아가, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 과당-6-인산-3-에피머화 효소는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 것일 수 있고, 또한 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 상동성을 가지는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 것일 수 있다. 코돈 축퇴성(codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 이와 상동성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드

역시 본 출원의 범위에 포함될 수 있음은 자명하다.

[31] 상기에서 용어 "상동성"은 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다. 상기에서 용어 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 예를 들어, 이러한 조건은 문헌(예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다.

[32] 본 출원에서 상기 엄격한 조건은 상동성을 확인하기 위해 조절될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 간의 상동성을 확인하기 위하여, 55℃의 Tm 값에 대응하는, 낮은 엄격도의 혼성화 조건이 이용될 수 있는데, 예를 들어, 5XSSC, 0.1% SDS, 0.25% 밀크, 및 무 포름아미드; 또는 30% 포름아미드, 5XSSC, 0.5% SDS 조건이 이용될 수 있다. 온화한 엄격도의 혼성화 조건은 높은 Tm 값에 대응하며, 예를 들어, 5X 또는 6XSSC를 갖는 40% 포름아미드가 사용될 수 있다. 높은 엄격도의 혼성화 조건은 가장 높은 Tm 값에 대응하며, 예를 들어, 50% 포름아미드, 5X 또는 6XSSC 조건이 이용될 수 있다. 다만, 상기 예에 제한되는 것은 아니다.

[33] 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.

[34] 구체적으로, 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드는 55℃의 Tm 값에서 혼성화 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하고 상술한 조건을 사용하여 탐지할 수 있다. 또한, 상기 Tm 값은 60℃, 63℃ 또는 65℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고 그 목적에 따라 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[35] 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다. 두 뉴클레오티드 서열 사이의 유사성 또는 상동성 정도가 더 클수록, 그러한 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드의 하이브리드에 대한 Tm 값은 더 커질 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 혼성화의 상대적 안정성(더 높은 Tm 값에 대응하는)은

하기 순서로 감소한다: RNA : RNA, DNA : RNA, DNA : DNA. 길이가 100 뉴클레오티드 보다 큰 하이브리드에 대하여, Tm 값 계산 수식은 공지되어 있다(Sambrook et al., supra, 9.50-9.51 참조). 더 짧은 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드와의 혼성화에 대하여, 미스매치 위치는 보다 더 중요할 수 있고, 올리고뉴클레오티드의 길이가 그 특이성을 결정할 수 있다(Sambrook et al., supra, 11.7-11.8 참조).

[36] 구체적으로, 폴리뉴클레오티드는 500 mM 염보다 낮고 적어도 37℃의 혼성화 단계, 및 적어도 63℃의 2XSSPE에서의 세척 단계를 포함하는 혼성화 조건을 사용하여 탐지될 수 있다. 상기 혼성화 조건은 200 mM 염보다 낮고 적어도 37℃의 혼성화 단계를 포함할 수 있다. 또는 상기 혼성화 조건은 혼성화 및 세척 단계 모두에서 63℃ 및 2XSSPE를 포함할 수 있다.

[37] 혼성화 핵산의 길이는 예를 들면, 적어도 약 10 뉴클레오티드, 15 뉴클레오티드, 20 뉴클레오티드, 또는 적어도 30 뉴클레오티드일 수 있다. 또한, 당업자는 온도 및 세척 용액 염 농도를 프로브의 길이와 같은 요소에 따라 필요할 경우 조절할 수 있다.

[38] 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소는 써모토가(*Thermotoga*) 속 유래의 효소일 수 있으며, 구체적으로 써모토가 네아폴리타나(*Thermotoga* neapolitana) 유래의 효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[39]

[40] 본 출원은 다른 하나의 양태로서, 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 암호화하는 핵산을 제공한다.

[41]

[42] 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 암호화하는 핵산을 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[43] 본 출원에서 용어 "형질전환"은 표적 단백질을 암호화하는 핵산 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 핵산이 암호화하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 핵산은 숙주세포 내에서 발현될 수 있기만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함할 수 있다. 또한, 상기 핵산은 표적 단백질을 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, 리보좀 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.

[44] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 출원의 목적 단백질을 암호화하는 핵산의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[45] 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, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌 글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포좀법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[46] 상기 숙주 세포로는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주를 사용하는 것이 좋은데, 예를 들어 대장균일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[47]

[48] 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소, 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 발현하는 미생물 또는 본 출원의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 포함하는 알룰로스 생산용 조성물을 제공한다.

[49] 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은, 본 출원의 알룰로스 제조 경로(도 1 참고)에 관여하는 효소, 본 출원의 알룰로스 제조 경로에 관여하는 효소를 발현하는 미생물, 또는 본 출원의 알룰로스 제조 경로에 관여하는 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 추가적으로 포함할 수 있다. 다만, 이는 예시적인 것으로 본 출원의 과당-6-인산-에피머화 효소를 이용하여 알룰로스를 생산할 수 있다면, 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물에 포함되는 효소 및 알룰로스 생산에 이용되는 기질이 제한되지 않는다.

[50] 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소(allulose-6-phosphate phosphatase), 상기 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 추가적으로 포함할 수 있다.

[51] 또한, 본 출원의 알룰로스 생산용 조성물은 (a) (i) 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합, 포도당, 포도당-1-인산, 포도당-6-인산, 또는 과당-6-인산; (ii) 포스페이트(phosphate); (iii) 알룰로스-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 (b) 상기 항목 (a)의 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 항목 (a)의 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 추가적으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[52] 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. 본 출원의 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. 본 출원의 전분 액당화 효소인 α-아밀라아제(α-amylase, EC 3.2.1.1), 풀루란아제(pullulanse, EC 3.2.1.41), 글루코아밀라아제(glucoamylase, EC 3.2.1.3) 및 이소아밀라아제(isoamylase)는 전분 또는 말토덱스트린을 포도당으로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 본 출원의 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.
포도당인산화효소(glucokinase)는 포도당에 인산을 전이시켜 포도당-6-인산으로 전환하는 활성을 가지는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 포도당인산화효소는 폴리포스페이트 의존형 포도당인산화효소일 수 있으며, 보다 구체적으로 아미노산 서열번호 5 및 염기 서열번호 7의 *Deinococcus* geothermalis 유래 폴리포스페이트-의존형 포도당인산화효소 또는 아미노산 서열번호 6 및 염기 서열번호 8의 *Anaerolinea* thermophila 유래 폴리포스페이트-의존형 포도당인산화효소일 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 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소는 알룰로스-6-인산을 알룰로스로 전환시키는 활성을 갖는 단백질이라면 어떠한 단백질도 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소는 비가역적으로 알룰로스-6-인산을 알룰로스로 전환시키는 활성을 갖는 단백질일 수 있다.

[53]

[54] 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소, 상기 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 발현하는 미생물의 배양물을 접촉시켜 과당-6-인산을 알룰로스-6-인산(allulose-6-phosphate)으로 전환하는 단계를 포함하는 알룰로스 제조방법을 제공한다.

[55] 본 출원의 제조방법은 본 출원의 과당-6-인산을 알룰로스-6-인산으로 전환하는 단계 이후, 알룰로스-6-인산(allulose-6-phosphate)에 알룰로스-6-인산

탈인산화효소, 상기 알룰로스-6-인산 탈인산화효소를 발현하는 미생물 또는 상기 알룰로스-6-인산 탈인산화효소를 발현하는 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 알룰로스-6-인산을 알룰로스로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[56] 또한, 본 출원의 제조방법은 본 출원의 과당-6-인산을 알룰로스-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.

[57] 또한, 본 출원의 제조방법은 본 출원의 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.

[58] 또한, 본 출원의 제조방법은 본 출원의 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당(Glucose)에 포도당 인산화 효소, 상기 포도당 인산화 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 포도당 인산화 효소를 발현하는 미생물의 배양물, 및 포스페이트를 접촉시켜, 상기 포도당을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[59] 또한, 본 출원의 제조방법은 본 출원의 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.

[60] 또한, 본 출원의 제조방법은 본 출원의 포도당을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합에 α-아밀라아제, 풀루란아제, 글루코아밀라아제, 수크라아제 또는 이소아밀라아제; 상기 아밀라아제, 플루란아제 또는 수크라아제를 발현하는 미생물; 또는 상기 아밀라아제, 플루란아제 또는 수크라아제를 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[61] 본 출원의 제조방법은 포도당에 4-α-글루카노트랜스퍼라아제, 상기 4-α-글루카노트랜스퍼라아제를 발현하는 미생물 또는 상기 4-α-글루카노트랜스퍼라아제를 발현하는 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기

포도당을 전분, 말토덱스트린 또는 수크로스로 전환하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[62] 본 출원의 제조방법에 있어서, 본 출원의 '접촉'은 pH 5.0 내지 10.0, 50℃ 내지 90℃, 및/또는 1분 내지 24시간 동안 실시할 수 있다. 구체적으로, 본 출원의 접촉은 pH 5.0 내지 9.0, pH 5.0 내지 8.0, pH 5.0 내지 7.0, pH 5.0 내지 6.0, pH 6.0 내지 10.0, pH 6.0 내지 9.0, pH 6.0 내지 8.0, pH 6.0 내지 7.0, pH 7.0 내지 10.0, pH 7.0 내지 9.0, pH 7.0 내지 8.0, pH 8.0 내지 10.0, pH 8.0 내지 9.0, 또는 pH 9.0 내지 10.0에서 실시할 수 있다. 또한, 본 출원의 접촉은 55℃ 내지 90℃, 60℃ 내지 90℃, 60℃ 내지 75℃, 65℃ 내지 75℃, 또는 60℃ 내지 70℃에서 실시할 수 있다. 더불어, 본 출원의 접촉은 1분 내지 12시간, 1분 내지 6시간, 1분 내지 3시간, 1분 내지 1시간, 5분 내지 24시간, 5분 내지 12시간, 5분 내지 6시간, 5분 내지 3시간, 5분 내지 1시간, 10분 내지 24시간, 10분 내지 12시간, 10분 내지 6시간, 10분 내지 3시간, 또는 10분 내지 1시간 동안 실시할 수 있다.

[63] 본 출원은 또 다른 하나의 양태로서, 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합, 및 포스페이트에 (a) 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소; 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소; 포도당-6-인산-이성화효소; 포스포글루코무타아제 또는 포도당 인산화 효소; 및 α-글루칸 포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제, 수크로오스 포스포릴라아제, α-아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀라아제, 글루코아밀라아제 또는 수크라아제; 또는 (b) 상기 항목 (a)의 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계를 포함하는, 알룰로스 제조방법을 제공한다.

[64]

발명의 실시를 위한 형태

[65] 이하 본 출원을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 출원을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 출원의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[66]

[67] **실시예** 1: 과당-6-인산-3-에피머화 효소의 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 및 형질전환 미생물의 제조

[68] 신규 내열성의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 발굴하기 위해 호열성 미생물인 써모토가 네아폴리타나(*Thermotoga* neapolitana)에서 유전자를 분리하였고, 재조합 발현벡터 및 형질전환 미생물을 제조하였다.

[69] 구체적으로, Genbank에 등록된 써모토가 네아폴리타나 유전자 서열들을 대상으로 과당-6-인산-3-에피머화 효소로 예상되는 유전자 fp3e를 선발하고, 이의 아미노산 서열(서열번호 1)과 염기 서열(서열번호 2) 정보를 바탕으로 정방향 프라이머(서열번호 3) 및 역방향 프라이머(서열번호 4)를 고안하여

합성하였다. 상기 합성된 프라이머를 이용하여 써모토가 네아폴리타나 염색체 DNA(genomic DNA)를 주형으로 중합효소 연쇄반응(PCR)을 95℃에서 30초 동안 변성, 55℃에서 30초 동안 어닐링 및 68℃에서 2분 동안 중합하였고 상기 반응들은 25회 반복한 조건을 사용하였으며, 제한효소 Nde 및 Xho을 사용하여 대장균 발현용 플라스미드 벡터 pET21a(Novagen사)에 삽입하여 CJ_tn_fp3e라 명명된 재조합 발현벡터를 제작하였다. CJ_tn_fp3e는 통상적인 형질전환 방법(참조: Sambrook et al. 1989)으로 대장균 BL21(DE3) 균주에 형질 전환하여 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 제조하고 *E.* coli BL21(DE3)/CJ_tn_fp3e로 명명하였다.

[70] 상기 *E.* coli BL21(DE3)/CJ_tn_fp3e 균주를 부다페스트 조약 하에 2016년 6월 23일자로 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 기탁하여 기탁번호 KCCM11848P를 부여 받았다.

[71]

[72] **실시예 2: 재조합 효소의 제조**

[73] 재조합 효소(이하, FP3E)를 제조하기 위해, *E.* coli BL21(DE3)/CJ_tn_fp3e를 LB 액체배지 5 ml를 포함하는 배양 튜브에 접종하고, 600 nm에서 흡광도가 2.0이 될 때까지 37℃의 진탕 배양기에서 종균 배양을 하였다. 이후, 종균 배양된 배양액을 LB 액체배지를 포함하는 배양 플라스크에 접종하여 본 배양을 진행하였다. 이후, 600 nm에서의 흡광도가 2.0이 될 때 1 mM IPTG를 첨가하여 FP3E의 발현생산을 유도하였다. 상기 종균 배양 및 본 배양은 교반 속도 200 rpm, 온도 37℃에서 실시하였다. 배양 완료 후, 배양액을 8,000×g로 4℃에서 20분 동안 원심분리 후 균체를 회수하였다. 50 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액으로 회수된 균체를 2회 세척하고, 동일 완충용액으로 현탁 후 초음파 세포파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄물은 13,000×g로 4℃에서 20분 동안 원심분리 후 상등액 만을 취하고, His-tag 친화 크로마토그래피를 사용하여 상기 상등액으로부터 FP3E를 정제하였다. 정제된 재조합 효소액은 50 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액으로 투석 후 효소의 특성 분석에 사용하였다.

[74] SDS-PAGE 분석을 통하여 분자량을 확인하였으며, 그 결과 상기 정제된 FP3E의 분자량은 약 25 kDa인 것을 확인하였다(도 2, E로 표시).

[75]

[76] **실시예 3: FP3E의 활성 확인**

[77] FP3E의 과당-6-인산에서 알룰로스-6-인산으로의 전환 활성 분석을 위하여 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액에 50 mM 과당-6-인산을 현탁하고, 이에 0.1 unit/ml의 정제된 FP3E를 첨가하여 70℃에서 1시간 동안 반응시켰다.

[78] 현재시점에서 알룰로스-6-인산 표준물질이 존재하지 않아 알룰로스-6-인산 생성 여부의 측정이 불가능한 바, 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소(alullose-6-phosphate phosphatase)인 파이테이즈(phytase)를 사용하여 알룰로스-6-인산을 알룰로스로 전환한 후 알룰로스의 생성 여부로 상기 전환

활성을 측정하였다. 구체적으로, 상기 반응 완료 후, 10 unit/ml 파이테이즈를 첨가하고 37℃에서 1 시간 동안 반응시켜 기질인 과당-6-인산과 산물인 알룰로스-6-인산을 모두 탈인산화 하였다. 이후, 과당 및 알룰로스를 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석은 Aminex HPX-87C(Bio-rad사) 컬럼을 사용하여 80℃에서 이동상으로 0.5 ml/min 유속으로 흘려 주면서 수행하였으며, 과당 및 알룰로스는 Refractive Index Detector로 검출하였다.

[79] 그 결과, FP3E의 반응 결과물에서 과당 및 알룰로스가 검출되었는바(도 3), FP3E가 과당-6-인산을 3-에피머화하여 알룰로스-6-인산을 생성하는 활성이 있음을 확인할 수 있었다(도 3).

[80]

[81] **실시예 4: pH, 온도, 금속이온 첨가에 따른 FP3E의 활성 확인**

[82] 4-1. pH에 따른 활성 확인

[83] FP3E에 대한 pH 영향성을 조사하기 위하여, 다양한 pH의 50 mM 완충용액(pH 4.0-7.0, 시트르산 나트륨; pH 6.0-8.0, 인산 칼륨: pH 7.0-9.0, Tris-HCl)에 현탁된 50 mM 과당-6-인산에 0.1 unit/ml의 정제된 FP3E를 첨가하여 70℃에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 실시예 3과 동일한 조건으로 파이테이즈와 반응시킨 후 HPLC를 이용하여 알룰로스를 정량 분석하였다.

[84] 그 결과, FP3E는 pH 7.0-8.0에서 최대 활성을 보였고, pH 5.0-10.0에 걸친 매우 광범위한 범위에서 최대 활성 대비 70% 이상의 활성이 유지됨을 확인할 수 있었다(도 4).

[85]

[86] **실시예 4: pH, 온도, 금속이온 첨가에 따른 FP3E의 활성 확인**

[87] 4-1. pH에 따른 활성 확인

[88] FP3E에 대한 pH 영향성을 조사하기 위하여, 다양한 pH의 50 mM 완충용액(pH 4.0-7.0, 시트르산 나트륨; pH 6.0-8.0, 인산 칼륨: pH 7.0-9.0, Tris-HCl)에 현탁된 50 mM 과당-6-인산에 0.1 unit/ml의 정제된 FP3E를 첨가하여 70℃에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 실시예 3과 동일한 조건으로 파이테이즈와 반응시킨 후 HPLC를 이용하여 알룰로스를 정량 분석하였다.

[89] 그 결과, FP3E는 pH 7.0-8.0에서 최대 활성을 보였고, pH 5.0-10.0에 걸친 매우 광범위한 범위에서 최대 활성 대비 70% 이상의 활성이 유지됨을 확인할 수 있었다(도 4).

[90]

[91] 4-3. 금속 이온 첨가에 따른 활성 확인

[92] 금속 이온 첨가가 FP3E의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 50 mM Tris-HCl(pH 7.0) 완충용액에 현탁된 50 mM 과당-6-인산에 각각의 금속이온($NiSO_4$, $CuSO_4$, $MnSO_4$, $CaCl_2$, $ZnSO_4$, $MgSO_4$, $MgCl_2$, $FeSO_4$, NaCl, LiCl 및 KCl)을 최종농도 0.5 mM로 첨가하였다. 이에, 금속 이온 제거를 위하여 10 mM EDTA를 처리하여 투석한 FP3E를 0.1 unit/ml 첨가하고, 70℃에서 10분 동안

반응시켰다. 이후, 실시예 3과 동일 조건으로 파이테이즈와 반응시킨 다음, HPLC를 이용하여 알룰로스를 정량 분석하였다.

[93] 그 결과, FP3E는 Ca 및 Cu 이온 첨가 시 활성이 약간 증가였으나, 그 외 금속이온 첨가에 의한 효소활성 변화는 거의 없었다. 따라서 금속 요구성 효소가 아님을 확인할 수 있었다(도 6).

[94] 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.

[95]

국 제 양 식

특허출원을 위한 부다페스트 국제 조약 하의 미생물 수탁 증명

국제기탁기관에 의해 규칙 7.1에 따라 발행된 원기탁에 대한 수탁증

수신: 씨제이제일제당 주식회사,
서울시 중구 동호로 330 CJ 제일제당센터

I. 미생물의 표시	
기탁자가 첨부한 미생물 식별에 대한 표시: *Escherichia coli* BL21(DE3)/CJ_tn_fp3e	국제 기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11848P
II. 과학적 성질의 설명 및/또는 분류학상의 위치	
항목 I에 표시된 미생물에 대하여 다음 사항이 포함되어 있다: ☐ 과학적 성질의 설명 ☐ 제안된 분류학상의 위치 (적용시 ☒ 표시)	
III. 기탁 및 수탁	
본 국제기탁기관은 2016년 6월 23일에 기탁된 항목 I에 표시된 미생물을 수탁하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 대한민국 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우편번호 120-861)	국제기탁기관을 대표하는 권한을 가진 자 또는 권한을 부여받은 공무원 서명: 서명일: 2016. 06. 23.

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2016 년 6월 30 일

변리사 손 민

[96]

[97]

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소(fructose-6-phosphate-3-epimerase).

[청구항 2] 제1항의 과당-6-인산-3-에피머화 효소를 암호화하는 핵산.

[청구항 3] 제2항의 핵산을 포함하는 형질전환체.

[청구항 4] 제1항의 과당-6-인산-3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 포함하는 알룰로스(allulose) 생산용 조성물.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 조성물은 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소(allulose-6-phosphate phosphatase), 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 추가적으로 포함하는, 알룰로스 생산용 조성물.

[청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 알룰로스 생산용 조성물은,

(a) (i) 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합; (ii) 포스페이트(phosphate); (iii) 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소; (iv) 포도당-6-인산-이성화효소; (v) 포스포글루코무타아제 또는 포도당 인산화 효소; 및 (vi) α-글루카노포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제, 수크로오스 포스포릴라아제, α-아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀라아제, 글루코아밀라아제 또는 수크라아제; 또는

(b) 상기 항목 (a)의 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 추가적으로 포함하는, 알룰로스 생산용 조성물.

[청구항 7] 과당-6-인산(fructose-6-phosphate)에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시켜 과당-6-인산을 알룰로스-6-인산(allulose-6-phosphate)으로 전환하는 단계를 포함하는 알룰로스 제조방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 방법은 상기 과당-6-인산을 알룰로스-6-인산으로 전환하는 단계 이후, 알룰로스-6-인산에 알룰로스-6-인산 탈인산화효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 알룰로스-6-인산을 알룰로스로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 알룰로스 제조방법.

[청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 방법은 상기 과당-6-인산을 알룰로스-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당-6-인산(glucose-6-phosphate)에 포도당-6-인산-이성화효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 알룰로스 제조방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 방법은 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당-1-인산(glucose-1-phosphate)에

포스포글루코무타아제, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 알룰로스 제조방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 방법은 상기 포도당-6-인산을 과당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 포도당(glucose)에 포도당 인산화 효소, 이를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물, 및 포스페이트를 접촉시켜, 상기 포도당을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 알룰로스 제조방법.

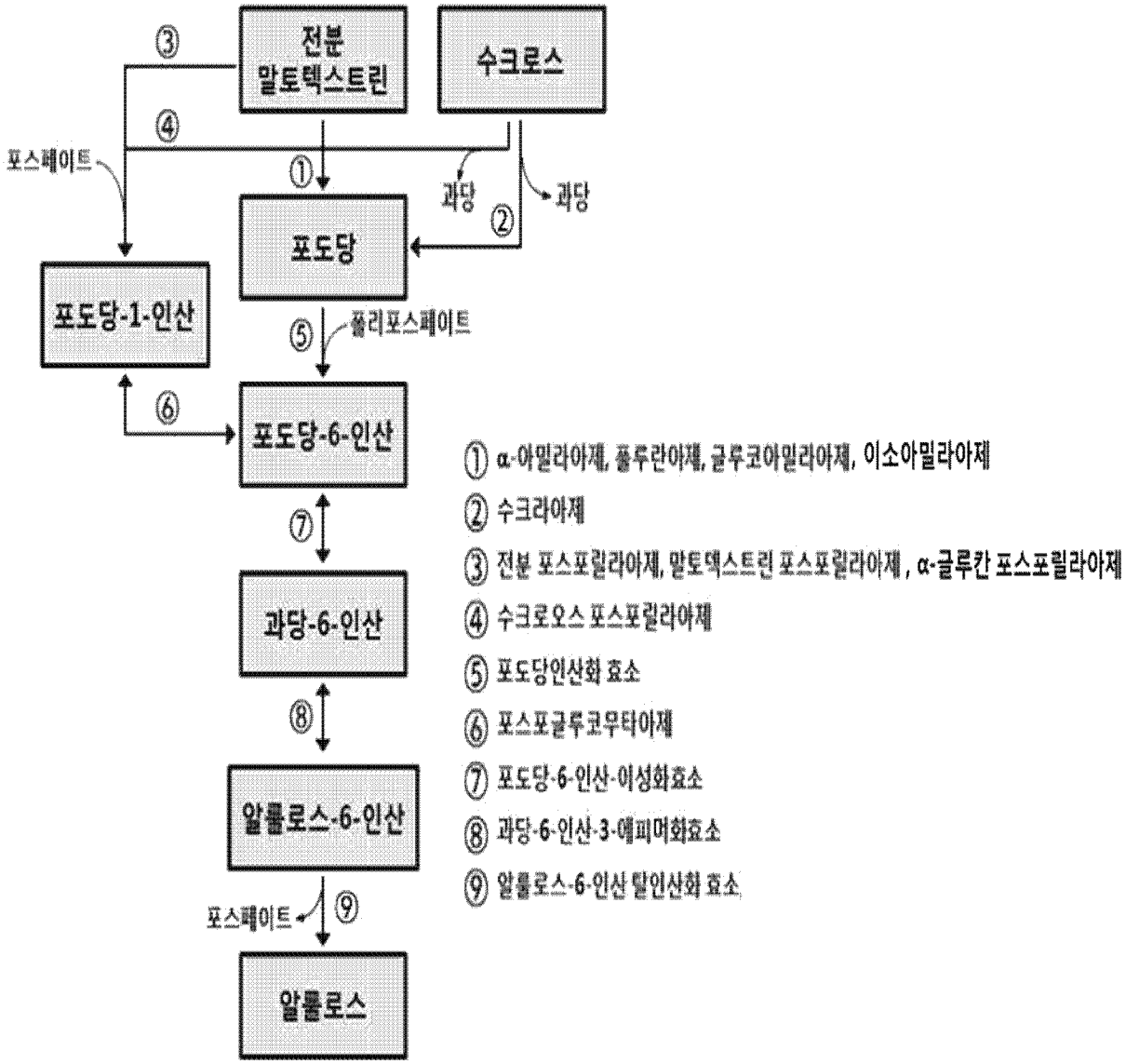
[청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 방법은 상기 포도당-1-인산을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합에 α-글루카노포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제 또는 수크로오스 포스포릴라아제; 이를 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물, 및 포스페이트를 접촉시켜, 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당-1-인산으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 알룰로스 제조방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서, 상기 방법은 상기 포도당을 포도당-6-인산으로 전환하는 단계 이전, 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합에 α-아밀라아제, 풀루란아제, 글루코아밀라아제, 수크라아제 또는 이소아밀라아제; 이를 발현하는 미생물; 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시켜, 상기 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합을 포도당으로 전환하는 단계를 추가적으로 포함하는, 알룰로스 제조방법.

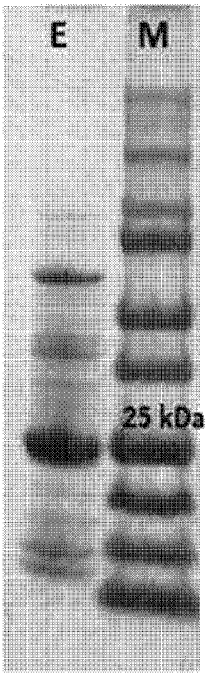
[청구항 14] 제7항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접촉은 pH 5.0 내지 10.0, 온도 50℃ 내지 90℃, 및/또는 1분 내지 24시간 동안 실시하는, 알룰로스 제조방법.

[청구항 15] 전분, 말토덱스트린, 수크로스 또는 이의 조합, 및 포스페이트에 (a) 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소; 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 과당-6-인산-3-에피머화 효소; 포도당-6-인산-이성화효소; 포스포글루코무타아제 또는 포도당 인산화 효소; 및 α-글루칸 포스포릴라아제, 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제, 수크로오스 포스포릴라아제, α-아밀라아제, 풀루란아제, 이소아밀라아제, 글루코아밀라아제 또는 수크라아제; 또는 (b) 상기 항목 (a)의 효소를 발현하는 미생물 또는 상기 미생물의 배양물을 접촉시키는 단계를 포함하는, 알룰로스 제조방법.

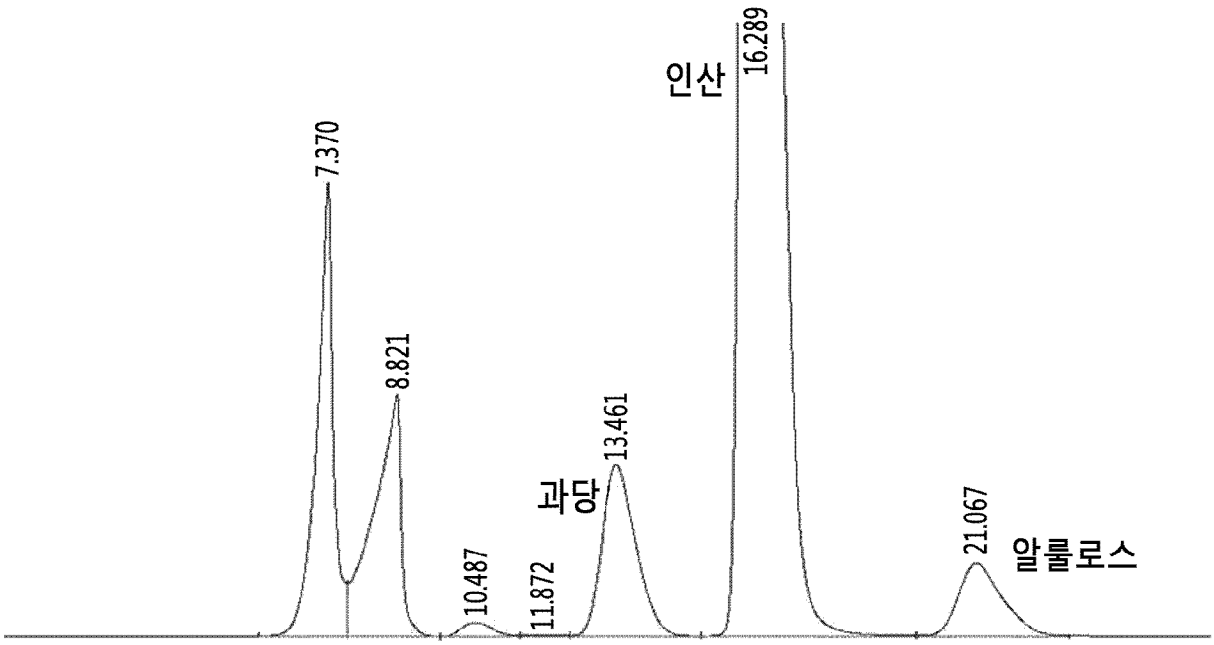
[도1]


③
전분
말토텍스트린
수크로스
④
포스페이트
①
과당
과당
②
포도당
포도당-1-인산
⑤
폴리포스페이트
⑥
포도당-6-인산
⑦
과당-6-인산
⑧
알룰로스-6-인산
포스페이트
⑨
알룰로스
① α-아밀라아제, 풀루란아제, 글루코아밀라아제, 이소아밀라아제
② 수크라아제
③ 전분 포스포릴라아제, 말토덱스트린 포스포릴라아제, α-글루칸 포스포릴라아제
④ 수크로오스 포스포릴라아제
⑤ 포도당인산화 효소
⑥ 포스포글루코무타아제
⑦ 포도당-6-인산-이성화효소
⑧ 과당-6-인산-3-에피머화효소
⑨ 알룰로스-6-인산 탈인산화 효소

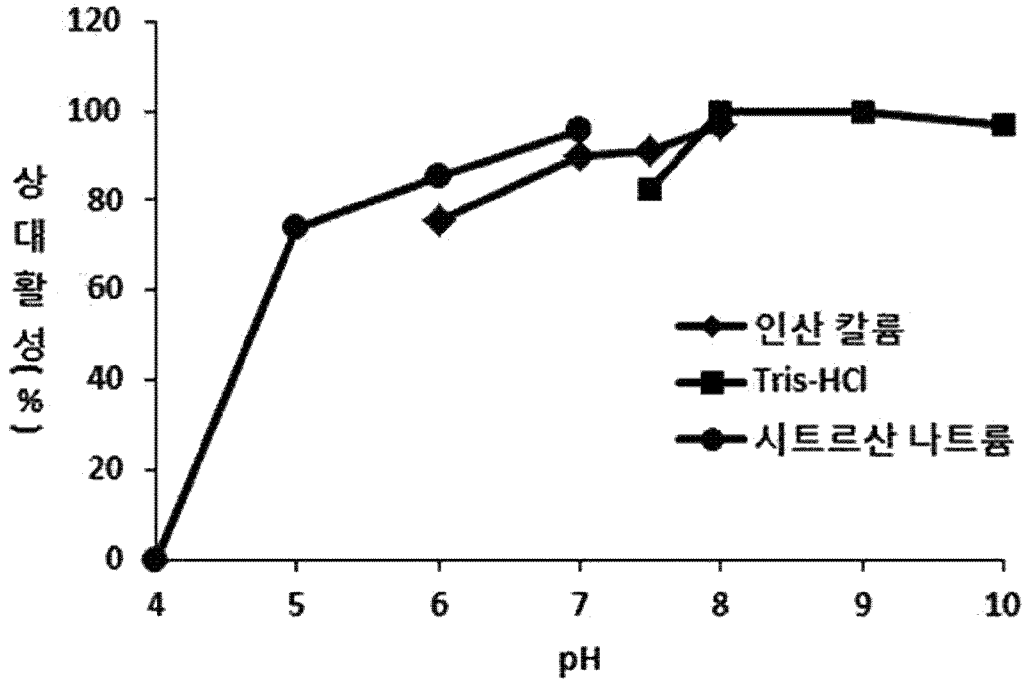
[도2]


E
M
25 kDa

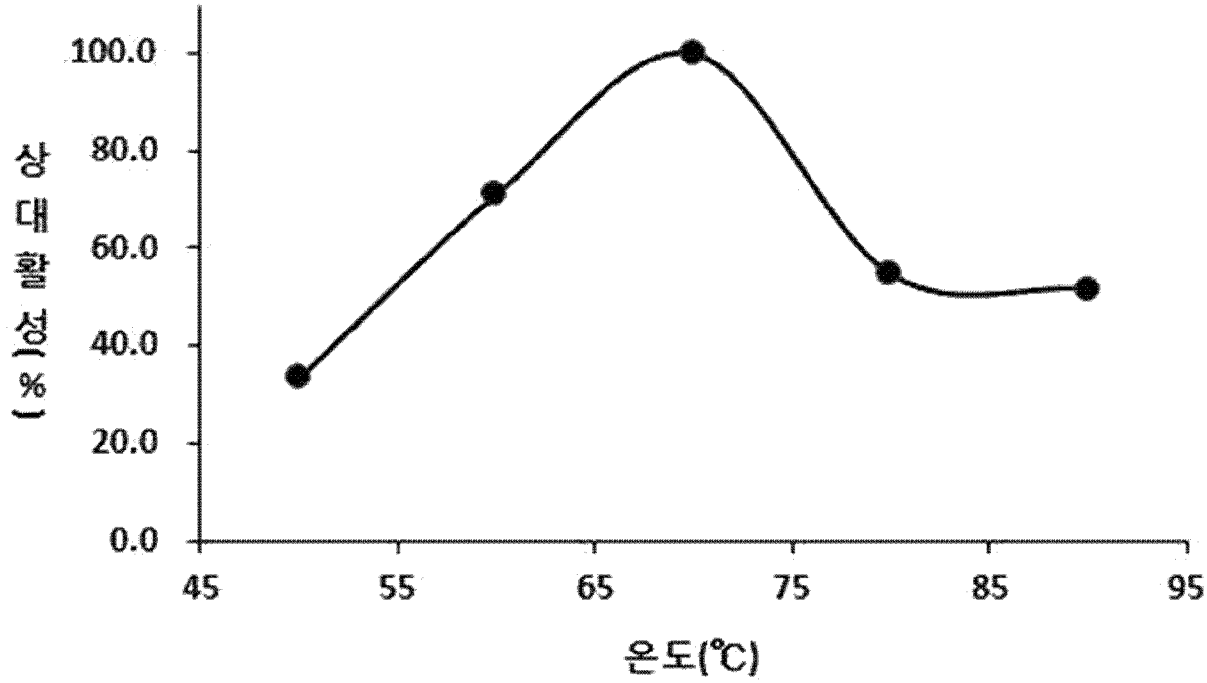
[도3]


7.370
8.821
10.487
11.872
과당
13.461
인산
16.289
21.067
알룰로스

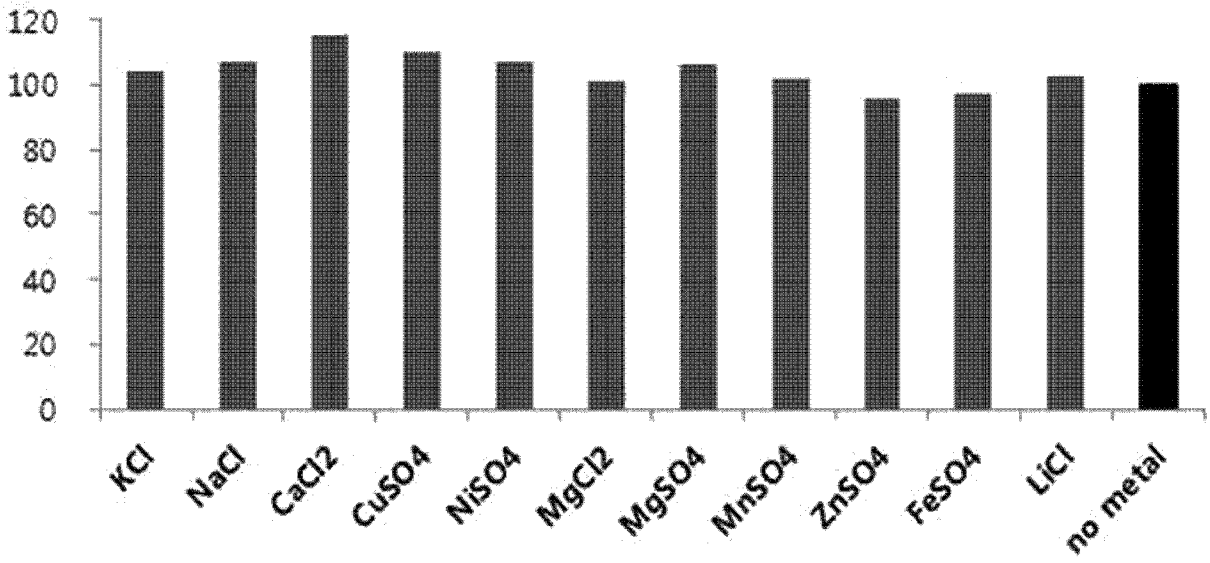
[도4]


120
100
80
60
40
20
0
상대활성(%)
4
5
6
7
8
9
10
pH
인산 칼륨
Tris-HCl
시트르산 나트륨

[도5]


100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
상대활성(%)
45
55
65
75
85
95
온도(℃)

[도6]


120
100
80
60
40
20
0
KCl
NaCl
CaCl2
CuSO4
NiSO4
MgCl2
MgSO4
MnSO4
ZnSO4
FeSO4
LiCl
no metal