(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 3 월 12 일 (12.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/050663 A1

(51) 국제특허분류:
C07H 17/04 (2006.01) *C12P 17/04* (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01) *C12P 19/02* (2006.01)
C07D 307/20 (2006.01) *C12P 19/14* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/011509

(22) 국제출원일: 2019 년 9 월 5 일 (05.09.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0106552 2018 년 9 월 6 일 (06.09.2018) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김경헌 (**KIM, Kyoung Heon**); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200, 18동, 805호 (서초4동, 삼풍아파트), Seoul (KR). 김동현 (**KIM, Dong Hyun**); 49374 부산시 사하구 감천로 105번길 40 (감천동 감천아파트) 2동 305, Busan (KR). 윤은주 (**YUN, Eun-Ju**); 08640 서울시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥동, 현대빌라), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (**DANA PATENT LAW FIRM**); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 4~6층, Seoul (KR).

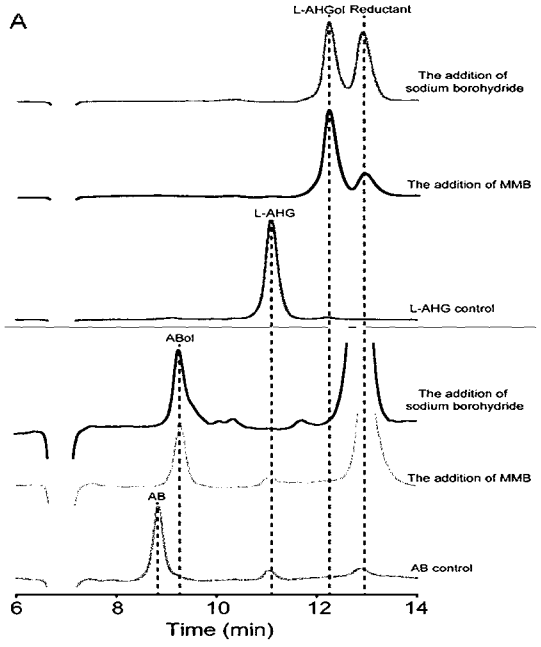
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, 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, 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,

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCTION OF NOVEL SUGAR ALCOHOL FROM RED ALGAE

(54) **발명의 명칭:** 홍조류로부터 신규한 당알코올 생산 방법

[도1a]



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for chemical production of 3,6-anhydro-L-galactitol (L-AHGol), which is a novel sugar alcohol, and agarobititol (ABol), which is a disaccharide having the same agarobititol as a reductant end thereof, from sea algae.

(57) **요약서:** 본 발명은 해조류로부터 신규한 당 알코올인 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 및 이것을 환원성 말단으로 가지는 이당류 형태인 아가로바이티톨(agarobititol; ABol)을 화학적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/050663 A1

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).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 홍조류로부터 신규한 당알코올 생산 방법

기술분야

[1] 본 발명은 해조류로부터 신규한 당 알코올인 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 및 이것을 환원성 말단으로 가지는 이당류 형태인 아가로바이티톨(agarobititol; ABol)을 화학적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 해양은 고압, 저온, 저산소 및 저광과 같은 육지와는 다른 독특한 환경을 지니고 있다. 이로 인해 육상생물과 달리 해양생물은 그 고유의 독특한 특성을 지니고 있다. 그 중 해조류는 육상식물과 달리 해양에서 서식함으로 인해 수분을 잘 흡수하고 이를 잘 보존하는 등 매우 독특한 특성을 지니고 있다. 해조류 중 특히 홍조류인 한천은 수분을 보유하여 겔을 형성함으로써 식품 및 의약 산업에 널리 이용되고 있다. 이런 한천을 구성하는 주요한 다당체인 아가로스는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)와 D-갈락토오스가 알파-1,3-결합과 베타-1,4-결합이 교차적으로 번갈아가며 연결되어 있는 중합체이다. 이 중 L-AHG는 육상생물에 존재하지 않는 희귀한 당으로서 미백 및 보습 효과가 뛰어나 화장품 소재로 사용될 수 있으며, 항염증, 항충치 및 대장암 예방 효과를 가진 복합 기능성 고부가가치 소재이다. 이런 L-AHG의 기능성 때문에 고부가가치 소재로 사용하기 위해 홍조류로부터 L-AHG를 생산하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 뿐만 아니라, L-AHG를 환원말단에 지니고 있는 이당류인 아가로바이오스(agarobiose; AB) 역시 뛰어난 항염증 효과를 지니고 있다고 알려져 있다.

[3] 그러나, L-AHG 및 아가로바이오스는 고온 및 산 조건에서 매우 불안정하여 5-히드록시메틸퍼퓨랄(5-hydroxymethyl furfural)로 쉽게 전환되어 그 기능성을 상실하는 단점이 있다.

[4] 당알코올은 당의 알데하이드기 또는 케톤기에 수소가 첨가되면서 알코올기로 치환된 당류의 총칭이다. 이런 당알코올은 천연당에는 없는 다양한 기능을 지니고 있으며, 천연당보다 감미도가 낮고 청량감을 나타낸다. 이런 이유로 솔비톨, 자일리톨, 만니톨 등의 많은 당알코올들이 식품첨가물로 사용되고 있으며, 말티톨, 락티톨, 에리스리톨 등은 그 자체로 식품으로 취급되고 있다. 또한, 당알코올은 화학 및 생물학적 촉매반응을 통해서 유용한 화학물질로 전환될 수 있다. 이렇듯 당알코올은 잠재적인 고부가가치 소재이며, 신규한 당알코올을 생산하는 것은 필요하다.

[5] 본 발명자들은 L-AHG 및 아가로바이오스의 당 알코올 형태인 L-AHGol 및 ABol을 제조함으로써 L-AHG 및 아가로바이오스의 단점을 보완하고 상기

복합기능성을 확인하고자 하였다.

[6] [선행기술문헌]

[7] [특허문헌]

[8] 한국 등록 특허 제10-1864800호(2018.05.30)

[9] [비특허문헌]

[10] (비특허문헌1) HT Kim *et al., Bioresour. Technol.* (2012) 107:301-306

[11] (비특허문헌2) HT Kim *et al., Bioresour. Technol.* (2013) 136:582-587

[12] (비특허문헌3) CH Lee *et al., Appl. Environ. Microbiol.* (2014) 80:5965-5973

[13] (비특허문헌4) CH Lee *et al., Process Biochem.* (2015) 50: 1629-1633

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[15] 본 발명의 목적은 아가로스 또는 아가로부터 산 가수분해 및 환원제를 이용한 화학적 환원반응을 통해 당 알코올을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 아가로스 또는 아가로부터 효소적 당화 반응 및 환원제를 이용한 화학적 환원반응을 통해 당 알코올을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[17] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 건조중량 기준으로 5 내지 30%(w/w)의 아가로스 또는 아가를 기질로 사용하여 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산을 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시키는 산 가수분해를 통해 아가로바이오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG) 중 하나 이상의 당을 제조하는 단계; 및

[18] (2) 상기 제조된 당에 환원제를 처리하는 단계를 포함하는, 아가로스 또는 아가로부터 아가로바이티톨(agarobititol; ABol) 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 중 하나 이상의 당 알코올을 제조하는 방법을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한 (1) 기질인 아가로스 또는 아가를 엔도-베타-아가레이즈(endo beta-agarase), 엑소-베타-아가레이즈(exo beta-agarase) 및 네오아가로바이오스 가수분해효소(neoagarobiose hydrolase)를 사용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)로 당화시키는 단계; 및

[20] (2) 상기 제조된 3,6-안하이드로-L-갈락토스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)에 환원제를 처리하여 환원시키는 단계를 포함하는, 아가로스 또는 아가로부터 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)를 제조하는 방법을 제공한다.

[21] 본 발명에서 최종적으로 생산하고자 하는 물질은 아가로바이티톨(agarobititol;

ABol) 또는 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)로 지칭되는 아가로스 또는 아가에서 유래된 당 알코올이다. 상기 두 종류의 당 알코올은 아가로바이오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)가 환원제를 통하여 환원된 형태이다. 상기 아가로바이오스 또는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)의 제조방법은 본 발명의 상기 선행기술문헌에 기술된 이전 연구를 통해서, 한천 또는 아가로스로부터 크게 3가지 방법으로 제조되었다. 첫 번째는 강산을 이용하여 고온에서 아가로스 또는 아가를 가수분해하는 방법으로 L-AHG의 수율은 떨어지지만 비교적 공정이 단순하여 경제적이다. 두 번째는 베타-아가레이즈 시스템을 이용하는 것으로, 엔도 및 엑소-베타-아가레이즈(endo- and exo-type beta-agarase)와 네오아가로바이오스 가수분해 효소(neoagarobiose hydrolase)를 이용하는 것이다. 이는 여러 가지 효소를 사용해야 함으로 공정이 복잡하지만 효소를 사용함으로써 수율이 높다는 장점이 있다. 세 번째는 산 또는 화학 촉매를 이용해서 아가로스 또는 한천을 액화 시킨 후 여러 효소를 이용하여 당화시켜 L-AHG를 생산하는 방법이다. 이 역시 액화 과정 이후 베타-아가레이즈들을 이용하여 당화하기 때문에 두 번째와 유사해 공정이 복잡하지만 수율이 높다는 장점이 있다. 따라서 본 발명에서는 상기 방법을 이용하여 아가로바이오스 및 L-AHG를 생산한 후, 환원제를 이용하여 상기 생성물을 환원시킴으로써 ABol 및 L-AHGol로 전환함으로써 본 발명을 완성하였다.

[22] 또한, 본 발명의 방법은 크게 아가로스 또는 아가를 가수분해 또는 당화시키는 단계와 환원단계로 나뉘어지고, 상기 단계들은 단일 반응기 내에서 동시에 수행되는 것을 특징으로 하므로, 각 단계의 구체적인 반응 조건은 이전에 수행된 조건과 다를 수 있다.

[23] 산 가수분해를 이용하는 본 발명의 방법에 있어서, 상기 아가로스 또는 아가의 강산 처리 시 0.1 내지 5%(w/v) 농도, 더 구체적으로, 0.5 내지 3%(w/v) 농도의 강산을 사용할 수 있다. 상기 농도의 범위인 경우, 아가로스 또는 아가의 강산 처리에 의한 5-HMF의 생산을 최소화할 수 있고, 동시에 고농도의 아가로바이오스를 생산하여 고수율의 AHG의 생산이 가능하다.

[24] 또한, 상기 아가로스 또는 아가에 대한 강산 처리는 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산과 80 내지 140℃에서 5분 내지 300분 동안 반응시키는 것일 수 있다. 구체적으로, 2%(w/v) 농도의 강산과 90℃에서 5분 내지 300분 동안 반응시키는 것일 수 있고, 상기 조건에서 아가로스 또는 아가는 아가로바이오스로 대부분 산 가수분해가 일어날 수 있다.

[25] 또한, 아가로바이오스가 L-AHG로 더 가수분해하기 위해서는 더 강한 반응조건이 요구되고, 구체적으로 2%(w/v) 농도의 강산과 120℃에서 10분 내지 30분 동안 반응시킬 수 있다.

[26] 상기 강산은 인산, 황산, 염산 또는 질산 등일 수 있다. 보다 구체적으로, 인산일 수 있다.

[27] 강산 처리에 사용되는 상기 아가로스 또는 아가의 함량은 건조중량 기준으로 5 내지 20%(w/v), 더 구체적으로 10%(w/w)으로 사용될 수 있다. 상기 범위 내일 경우 90%, 95%, 또는 98% 이상의 액화율을 나타낼 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우 기질의 분해율이 현저히 저하될 수 있다.

[28] 본 발명의 또 다른 일 실시예에서, 아가로스 또는 아가로부터 L-AHG를 제조하는 방법으로, 엔도-베타-아가레이즈, 엑소-베타-아가레이즈 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 이용하여 상기 아가로스 또는 아가를 아가로바이오스를 거치지 않고 직접 L-AHG로 당화시킬 수 있고, 이와 같은 효소적인 방법은 산 가수분해 방법과 비교하여 L-AHG의 생산 수율을 증가시킬 수 있다.

[29] 상기 엔도-베타-아가레이즈, 엑소-베타-아가레이즈 및 네오아가로바이오스 가수분해효소는 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[30] 상기 엔도-베타-아가레이즈, 엑소-베타-아가레이즈 및 네오아가로바이오스 가수분해효소는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 기재된 염기 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로바이오스의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 서열번호 1 내지 3에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

[31] 상기 엔도-베타-아가레이즈는 박테로이데스 플레베이우스(*Bacteroides plebeius*) 유래이고, 상기 엑소-베타-아가레이즈 및 상기 네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스 2-40T(*Saccharophagus degradans* 2-40T) 유래인 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[32] 상기 엔도-베타-아가레이즈, 엑소-베타-아가레이즈 및 네오아가로바이오스 가수분해효소는 박테로이데스 플레베이우스(*Bacteroides plebeius*) 및 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^{T}의 세포 파쇄물 또는 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 상기 균주 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 파쇄물 또는 배양액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호

6에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.

[33] 상기 아가 또는 아가로스와 엔도-베타-아가레이즈, 엑소-베타-아가레이즈 및 네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응은 순차적으로 수행될 수 있다. 구체적으로, 아가 또는 아가로스를 기질로 하는 엔도-베타-아가레이즈의 효소반응은 40 내지 60℃의 온도 범위에서 5시간 내지 48시간 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 50℃의 온도 범위에서 6시간 동안 실시할 수 있다. 그 다음, 상기 엔도-베타-아가레이즈 효소반응 산물을 기질로 하는 엑소-베타-아가레이즈의 효소반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 1시간 내지 10시간 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 30℃의 온도 범위에서 2시간 동안 실시할 수 있다. 그 다음, 상기 엑소-베타-아가레이즈 효소반응 산물을 기질로 하는 네오아가로바이오스 가수분해효소의 효소반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 1시간 내지 10시간 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 30℃의 온도 범위에서 2시간 동안 실시할 수 있다.

[34] 본 명세서에서 "효소", "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[35] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc.Natl Acad. Sci* USA 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

[36] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.

[37] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.

[38] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.

[39] 본 발명에서 아가로바이오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG) 중 하나 이상의 당을 환원제를 이용하여 환원시키는 단계는 아가 또는 아가로스를 산 가수분해하는 단계 또는 효소로 당화시키는 단계와 동시에 수행되거나, 상기 단계 도중에 수행되거나, 또는 상기 단계가 종료되는 시점에 수행될 수 있다. 구체적인 일 실시예에서, 아가 또는 아가로스를 산 가수분해 하는 단계 또는 효소로 당화시키는 단계를 수행하여 최종산물이 충분히 생성된 종료 시점에 환원제를 이용하여 환원시킬 때, 최종생성물의 생산 수율이 우수함을 확인하였다.

[40] 상기 환원제는 몰폴린 보레인 (molpholine borane), 피페리딘 보레인 (piperidine borane), 피리딘 보레인 (pyridine borane), 피페라진 보레인 (piperazine borane), 2,6-루티딘 보레인 (2,6-lutidine borane), N,N-디에틸아닐린 보레인 (N,N-diethylaniline borane), 4-메틸몰폴린 보레인 (4-methylmorpholine borane), 1,4-옥사티안 보레인 (1,4-oxathiane borane), 암모늄(ammonium), 알칼리(alkali), 알칼리 토금속 보로하이드라이드(alkaline earth metal borohydrides), 하이포아인산염 (hypophosphites), 아황산염 (sulfites), 중아황산염 (bisulfites), 하이드로설파이트 (hydrosulfites), 메타중아황산염 (metabisulfites), 디티온산염 (dithionates), 테트라티오네이트 (tetrathionates), 티오황산염 (thiosulfates), 티오요소 (thioureas), 히드라진 (hydrazines), 히드록실아민 (hydroxylamines), 알데하이드 (aldehydes)[포름알데히드(formaldehyde) 및 글리옥살 (glyoxal)을 포함], 글리옥실산 (glyoxylic acid), 환원당 (reducing sugars), 및 그 조합들을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 환원제는 4-메틸몰폴린 보레인(4-methylmorpholine borane), 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride) 및 이들의 조합일 수 있다.

발명의 효과

[41] 본 발명은 아가로스 또는 아가로부터 신규한 바이오소재인 당알코올을 대량 생산할 수 있는 최적 조건을 확립하고, 특히, 환원제를 사용하여 화학적

환원반응을 통해 쉽고 효율적으로 당알코올로 전환시킬 수 있으며, 본 발명의 당알코올을 생산하는 공정은 단일 반응기내에서 산 가수분해 및 환원반응이 동시에 수행됨으로써 공정을 단순화하였다.

도면의 간단한 설명

[42] 도 1은 AB와 L-AHG를 각각 환원제인 MMB와 sodium borohydride를 이용하여 환원시켜 ABol 및 L-AHGol을 생산한 결과이다. (A) 다음의 HPLC 결과이다. (B) AB에서 ABol로 전환되는 구조 및 분자량이다. (C) LC/MS-IT-TOF 분석으로 ABol을 확인한 결과로 ABol의 tandem mass spectrum이고, 그것의 삽입 그림은 ABol의 mass spectrum 결과이다. (D)는 L-AHG에서 L-AHGol로 전환되는 구조 및 분자량이다. (E) LC/MS-IT-TOF 분석을 통한 L-AHGol의 mass spectrum 결과이다.

[43] 도 2는 본 발명에서 아가로스로부터 ABol를 생산하기 위한 개략적인 모식도이다. 단일 반응기내에서 산 가수분해 및 환원반응을 통해 아가로스로부터 ABol을 생산한다.

[44] 도 3은 단일 반응기내에서 아가로스로부터 ABol을 생산하기 위해 산 가수분해 동안 환원제를 첨가하는 시기에 따른 ABol 생산 HPLC 결과이다. (A)는 환원제를 초기인 0시간에 첨가한 후, 산 가수분해를 한 결과, (B)는 산 가수분해 30분 시점에서 환원제를 첨가하여 산 가수분해와 환원반응을 동시에 진행한 결과, (C)는 산 가수분해를 통해 AB를 최대한 생산한 후, 최종적으로 환원제를 첨가한 결과, (D)는 환원제를 분할하여 1/3의 양을 산 가수분해 처음(0분), 중간(150분) 및 최종(240분) 시점에 첨가한 결과이다.

[45] 도 4는 위의 방법으로 생산된 ABol을 함유하는 아가로스 가수분해물을 활성탄(activated charcoal)을 이용하여 ABol를 분리 및 정제한 각 분획별 HPLC 결과이다.

[46] 도 5는 본 발명에서 아가로스로부터 L-AHGol를 생산하기 위한 개략적인 모식도이다. (A)는 산 가수분해만으로 아가로스로부터 L-AHG를 생산한 후 환원반응을 통해 L-AHGol을 생산하는 모식도이다. (B)는 베타-아가레이즈 시스템을 이용하여 아가로스로부터 L-AHG을 생산하고 환원반응을 통해 L-AHGol을 생산하는 모식도이다.

[47] 도 6은 (A)는 아가로스로부터 산 가수분해를 통해 L-AHGol를 생산한 결과이다. (B)는 아가로스로부터 베타-아가레이즈 시스템을 이용하여 아가로스로부터 L-AHG를 생산한 TLC 결과이다. (C)는 베타-아가레이즈를 이용하여 얻어진 L-AHG를 환원반응을 통해 L-AHGol을 생산한 HPLC 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[49]

[50] **<실시예 1> 환원제를 이용하여 AB 및 L-AHG을 각각 ABol 및 L-AHGol로 전환**

[51] AB 및 L-AHGol에 상응하는 신규한 당알코올인 ABol 및 L-AHGol을 생산하기 위해 환원제를 이용하여 당을 당알코올로 전환할 수 있는 가능성을 검토하였다(도 1). 화학적 환원반응을 위해 환원제는 4-methylmorpholine borane(MMB) 또는 sodium borohydride를 사용하였다. 이때 HPLC 조건은 사용한 컬럼 HPX-87H, 유속 0.5 mL/min, 이동상 0.005 M H_2SO_4을 사용하였다. 그 결과, 도 1a에서와 같이 AB 및 L-AHG의 HPLC 머무름 시간이 당알코올로 전환됨에 따라 조금씩 뒤로 밀렸다. 이렇게 생긴 당알코올을 확인하기 위해 LC/MS-IT-TOF를 이용하여 분석하였다.

[52]

[53] **<실시예 2> Liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry (LC/MS-IT-TOF) 분석을 통한 ABol 및 L-AHGol 확인**

[54] ABol 및 L-AHGol을 분석하기 위해 LC/MS-IT-TOF을 이용하였다. 컬럼은 Hypercarb Porous Graphitic Carbon LC Column(100 X 2.1 mm, packed with 3 μm particles)을 사용하였으며, 분석하는 동안 LC column 온도는 70도로 유지하였다. 이동상은 25 μM lithium chloride와 acetonitrile로 구성되어있으며, 0.2 mL/min의 유속을 41분간 분석하는 동안 이동상을 0-80%로 기울기를 주었다. 전자분무이온화는 양이온 모드로 하였으며, source-dependent parameter들은 nebulizing gas flow가 1.5 L/min, interface 전압은 4.5 kV, 검출기 전압은 1.65 kV, curved desolvation line (CDL) 및 heat block 온도는 200도로 설정하였다. 질량 분석 범위는 100에서 700 *m/z*로 분석하였다.

[55] AB가 환원되어 ABol로 전환되면 도 1b와 같이 ABol의 분자량이 326이 된다. 여기에 리튬이온이 첨가되어 최종적으로 333으로 분석된다. 도 1c의 결과와 같이 ABol의 주요 피크가 333.2397로 나타났으며, ABol의 tandem mass spectrum를 통해 화학적인 구조를 확인한 결과, L-AHGol에 리튬이온이 첨가된 분자량인 171.1330과 갈락토오스에 물 분자가 빠진 것에 리튬이온이 첨가된 분자량인 169.1192가 분석되어 ABol이 L-AHGol과 갈락토오스로 구성되어있다는 것을 확인할 수 있었다.

[56] L-AHGol 역시 LC/MS-IT-TOF를 이용하여 분석하였다. 도 1d와 같이 L-AHG가 환원되어 L-AHGol로 전환되면 분자량이 162에서 164가 되고 리튬이온이 첨가되면 171을 나타낸다. 도 1e의 결과와 같이 L-AHGol을 분석한 결과, 171.1431 및 L-AHGol 두 분자에 리튬이온이 첨가된 형태인 335.2595가 분석되어 ABol을 가수분해함으로써 L-AHGol이 생성되었음을 확인하였다.

[57]

[58] **<실시예 3> 단일 반응기내 산 가수분해 및 환원반응을 통한 ABol 생산**

[59] 단일 반응기내에서 산 가수분해 및 환원반응을 통한 ABol을 생산하기 위해 아가로스를 산 가수분해하는 동안 환원제 첨가시기를 달리함으로써 ABol을 생산하였다. 공통적인 반응 조건은 다음과 같다. 산 가수분해를 위해 10%(w/w) 아가로스를 기질로 사용하였고, 2%(w/v)의 인산을 이용하여 90도에서 반응을

시켰다. 이 때 사용한 HPLC 컬럼은 Rezex ROA-Organic Acid이며, 이동상은 0.005 M H_2SO_4, 유속은 0.6 mL/min이다.

[60] ABol를 생산하기 위해 도 2과 같이 아가로스를 산 가수분해 하는 동안 환원제 첨가시기를 4가지로 달리 실시하였다. 이 때 사용한 환원제는 0. 45 M MMB를 사용하였다. 첫 번째 조건은 아가로스를 산 가수분해 하기 전 0시간에 환원제를 첨가하였다(도 3a). 그 결과, 시간이 지남에 따라 ABol이 생성되었지만, 최종 ABol의 생성량은 3.2 g/L로 넣어준 아가로스 대비 약 3.1% 매우 적게 생성되었다. 이것은 환원제가 강알칼리이기 때문에 초기에 넣어줌으로 인해 pH가 올라가서 인산에 의한 가수분해효과가 경감되어 이 조건에서 아가로스가 거의 가수분해 되지 않았다. 따라서 두 번째 조건은 산 가수분해를 통해 아가로스를 어느 정도 액화시킨 후 환원제를 첨가하여 산 가수분해와 환원작용을 함께 실시하였다(도 3b). 이 조건에서 환원제는 산 가수분해 시작 30분 후에 첨가하였다. 그 결과, 환원제를 첨가하기 전까지는 AB가 생성되다가 환원제를 첨가 후 AB가 ABol로 전환되면서 AB의 그래프는 사라졌다. 그 후 시간이 지남에 따라 ABol가 증가하였지만, 30분 때 18.8 g/L에서 최종 27.5 g/L로 적게 생성되었다. 이 역시 최종 생성된 ABol의 수율은 26.3%로 적은데, 아가로스가 산 가수분해로 인해 초기에 액화가 되었음에도 불구하고 환원제 첨가로 인해 인산 가수분해 효과가 경감되었기 때문이다. 세 번째 조건은 충분히 산 가수분해를 통해 아가로스로부터 AB를 생성시킨 후, 최종적으로 환원제를 첨가하여 AB를 ABol로 환원시키는 방법이다(도 3c). 그 결과, 시간이 지남에 따라 AB가 우세적으로 생성되고 AB가 더 이상 생성되지 않는 시점에 환원제를 첨가하였다. 이 조건에서 최종적으로 88.6 g/L로 약 85.2%의 매우 높은 ABol 수율을 나타냈다. 그러나 이 조건에서는 생성된 AB가 과분해되어 갈락토오스, L-AHGol, 및 5-HMF가 소량 생성되었다. 따라서 마지막 네 번째 조건은 과분해 산물을 막기 위해 환원제를 1/3로 분할하여 첨가하였다(도 3d). 환원제 첨가 시기는 산 가수분해 전 0시간 때, AB가 생성되는 시점인 150분 및 최종 240분에 나눠서 첨가하였다. 그 결과, 초기 30분때 생성된 ABol은 17.4 g/L으로 첫 번째 조건인 환원제를 초기에 첨가한 것 보다 더욱 많이 생성되었다. 그 후, 150분 때 42.9 g/L 및 최종 55.4 g/L의 ABoL을 생성하였다. 이 조건에서 비록 과분해산물인 5-HMF는 생성되지 않았지만, 세 번째 조건에 비해 최종 ABol 수율이 53.4%로 적었다.

[61]

[62] [표1]

The stage for the addition of reductant	Titer (g/L)	Yield (%, w/w)
At the beginning stage	3.2	3.1
At the middle stage	27.4	26.3
At the final stage	88.6	85.2
Pulse feeding	55.5	53.4

[63]

[64] **<실시예 4> 활성탄을 이용한 ABol 분리 및 정제**

[65] 위와 같이 아가로스를 산 가수분해 및 환원제를 이용하여 환원반응 시켜 얻은 ABol을 다량 포함하는 아가로스 분해물로부터 선택적으로 ABol를 분리 및 정제하기 위해 활성탄을 이용하였다. 기질 및 활성탄의 비율은 1:50으로 설정하였다. 예를 들어 기질인 아가로스 100 mg에 대해 활성탄 5 g을 사용하였다. 활성탄을 사용하기 전에 증류수로 몇 번에 걸쳐 세척 후 사용하였다. 그 후, 산 가수분해 및 환원반응을 통해 생성된 ABol를 함유하는 아가로스 분해물을 활성탄에 약 10분 동안 교반하면서 흡착시켰다. 그리고 10,000 rpm으로 10분 동안 원심분리를 통해서 흡착되지 않은 상층액 분획(supernatant)를 분석하였다. 그 결과, 도 4와 같이 산 가수분해 및 환원반응을 위해 사용한 인산 및 MMB가 활성탄에 흡착되지 않고 상층액에 존재하였으며 ABol를 비롯한 높은 DP의 당 및 당 알코올들은 활성탄에 흡착되었다. 이렇게 상층액을 제거함으로써 산 및 환원제를 제거하였고, 이를 증류수로 한 번 더 세척하였다. 그 후 20%(v/v) 에탄올을 이용하여 선택적으로 활성탄으로부터 ABol을 분리 및 정제 할 수 있었다.

[66]

[67] **<실시예 5> 아가로스로부터 L-AHGol 생산**

[68] 아가로스로부터 L-AHGol을 생산하기 위해 도 5와 같이 두 가지 방법으로 이용하였다. 첫 번째 도 5A와 같이 산을 이용하여 아가로스로부터 한번에 L-AHG를 생산한 후 최종적으로 환원반응을 통해 L-AHGol을 생산하였다. 앞서 아가로스로부터 AB를 생산하는 조건보다 더욱 강한 조건을 적용하였다. 구체적으로, 10%(w/v) 아가로스에 2%(w/v)의 인산을 가하고 120도에서 20분 반응을 시켰다. 그 후 환원제로서 0.45 M sodium borohydride를 이용하여 L-AHG를 환원시켜 L-AHGol을 생성하였다. 이때 HPLC 분석 조건은 컬럼 HPX-87H, 유속 0.5 mL/min, 이동상 0.005 M H_2SO_4을 사용하였다. 이 방법에서는 산 가수분해를 더욱 높은 조건에서 함으로써, L-AHG가 과분해되어 5-HMF가 다량 생성되었다. 따라서 최종 L-AHGol의 생성량은 매우 낮았다. 또한 AB가 단당인 L-AHG와 갈락토오스로 완전히 분해되지 않았기 때문에 상당량의 ABol

역시 생성되었다(도 6a).

[69] 따라서 두 번째 아가로스로부터 L-AHG을 보다 높은 수율로 생산하기 위해 베타-아가레이즈 시스템을 사용하였다(도 5b). 이 때 사용한 효소들은 *Bacteroides* plebeius DSM 17135 유래 엔도 타입 베타-아가레이즈 BpGH16A, *Saccharophagus degradans* 2-40T 유래 엑소 타입 베타-아가레이즈 Aga50D, 및 네오아가로바이오스 가수분해효소 *Sd*NABH이다. 상기 효소들을 암호화하는 서열번호 4 내지 6의 염기서열로 표시되는 유전자를 각각 pET21α 벡터를 사용하여 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)에 도입하였다. 재조합 단백질들을 얻기 위해 100 μg/mL 엠피실린이 포함된 LB 배지에서 37도 조건으로 대수증식기까지(OD 0.4~0.6) 자라면 0.1 mM 이소프로필-베타-디-씨오갈락토파이라노사이드(IPTG)를 넣고 16도에서 16시간 동안 재조합 단백질을 과발현시켰다. 그 후 세포 배양액을 4도, 10,000rpm 조건에서 20분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포내 재조합 단백질을 얻기 위해 완충용액(20 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 세포를 풀어 준 다음 초음파기기를 이용하여 세포를 파하였다. 이를 4도, 16,000rpm으로 20분동안원심분리한 후 히스트랩 컬럼(GE Health Care)을 사용하여 단백질을 분리 및 정제하였다. 이렇게 얻어진 재조합 단백질은 L-AHG을 생산하는데 사용하였다.

[70] BpGH16A 효소 반응은 기질 아가로스에 대해 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0)에서 50도에서 6시간 반응시켰다. 그 후 BpGH16A 반응산물인 네오아가로올리고당을 기질로 Aga50D를 30도에서 2시간 동안 반응시켰다. 최종적으로 Aga50D 반응산물에 *Sd*NABH을 30도, 2시간동안 반응시켜 L-AHG와 갈락토오스를 생산하였다(도 6b). 그리고 이 아가로스 효소 가수분해산물을 최종적으로 환원제로서 0.45 M sodium borohydride를 첨가하여 L-AHG을 L-AHGol로 전환시켰다(도 6c). 베타-아가레이즈 시스템을 이용하는 경우, 아가로스로부터 아가로바이오스가 생성되지 않고 직접 L-AHG가 생성되기 때문에 상기 환원제 처리로 생산되는 최종산물은 L-AHGol이고, 부산물로 Galol이 생성된다.

청구범위

[청구항 1] (1) 건조중량 기준으로 5 내지 30%(w/w)의 아가로스 또는 아가를 기질로 사용하여 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산을 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시키는 산 가수분해를 통해 아가로바이오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG) 중 하나 이상의 당을 제조하는 단계; 및

(2) 상기 제조된 당에 환원제를 처리하는 단계를 포함하는, 아가로스 또는 아가로부터 아가로바이티톨(agarobititol; ABol) 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 중 하나 이상의 당 알코올을 제조하는 방법.

[청구항 2] 제 1항에 있어서,

상기 단계 (2)의 환원제를 처리하는 단계는 상기 단계 (1)의 산 가수분해 단계와 동시에 수행되거나, 중간에 수행되거나 또는 상기 단계 (1)의 산 가수분해 반응이 종료되는 시점에 수행되는 것인, 아가로스 또는 아가로부터 아가로바이티톨(agarobititol; ABol) 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 중 하나 이상의 당 알코올을 제조하는 방법.

[청구항 3] 제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 환원제는 4-메틸몰폴린 보레인(4-methylmorpholine borane, MMB) 및 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride) 중 하나 이상인 것인, 아가로스 또는 아가로부터 아가로바이티톨(agarobititol; ABol) 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 중 하나 이상의 당 알코올을 제조하는 방법.

[청구항 4] (1) 기질인 아가로스 또는 아가를 엔도-베타-아가레이즈, 엑소-베타-아가레이즈 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 사용하여 3,6-안하이드로-L-갈락토스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)로 당화시키는 단계; 및

(2) 상기 제조된 3,6-안하이드로-L-갈락토스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)에 환원제를 처리하는 단계를 포함하는, 아가로스 또는 아가로부터 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)를 제조하는 방법.

[청구항 5] 제 4항에 있어서,

상기 엔도-베타-아가레이즈는 박테로이데스 플레베이우스(*Bacteroides plebeius*) 유래이고, 상기 엑소-베타-아가레이즈 및 상기 네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스 2-40T(*Saccharophagus degradans* 2-40T) 유래인 것인, 아가로스 또는 아가로부터 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)를

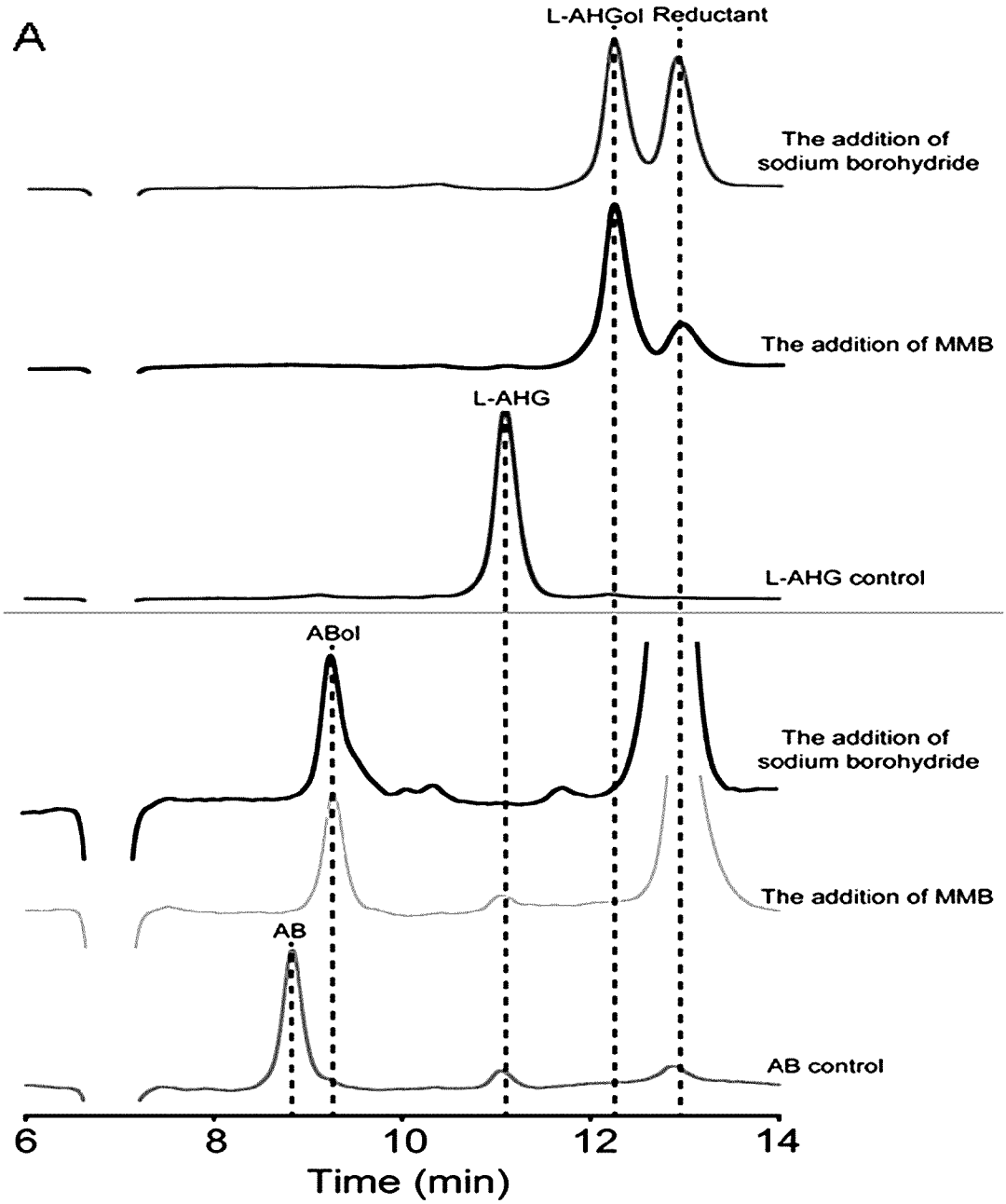
제조하는 방법.

[청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 엔도-베타-아가레이즈는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되고,
상기 엑소-베타-아가레이즈는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되고,
및 상기 네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 것인, 아가로스 또는 아가로부터 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)를 제조하는 방법.

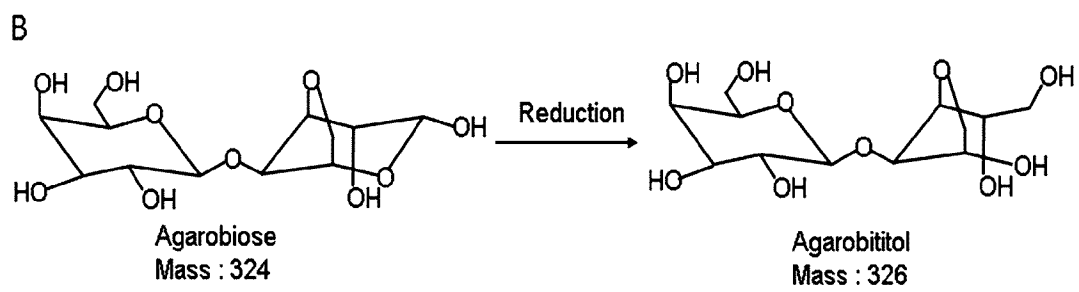
[청구항 7] 제 4항에 있어서,
상기 단계 (2)의 환원제를 처리하는 단계는 상기 단계 (1)의 아가로스 또는 아가의 당화 단계와 동시에 수행되거나, 중간에 수행되거나 또는 상기 단계 (1)의 당화 단계가 종료되는 시점에 수행되는 것인, 아가로스 또는 아가로부터 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)를 제조하는 방법.

[청구항 8] 제 4항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 환원제는 4-메틸몰폴린 보레인(4-methylmorpholine borane, MMB) 및 소듐 보로하이드라이드 중 하나 이상인 것인, 아가로스 또는 아가로부터 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)를 제조하는 방법.

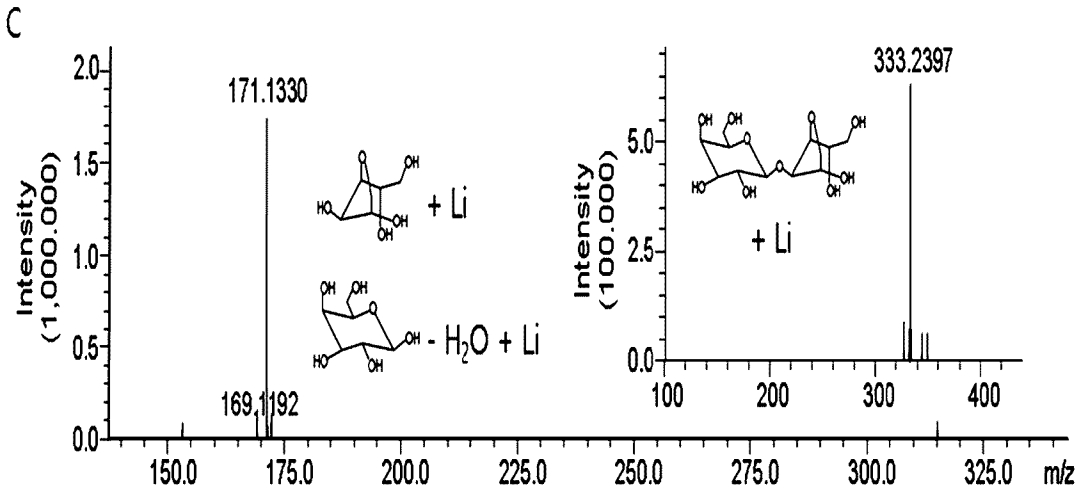
[도1a]


A
L-AHGol Reductant
The addition of sodium borohydride
The addition of MMB
L-AHG
L-AHG control
ABol
The addition of sodium borohydride
The addition of MMB
AB
AB control
6
8
10
12
14
Time (min)

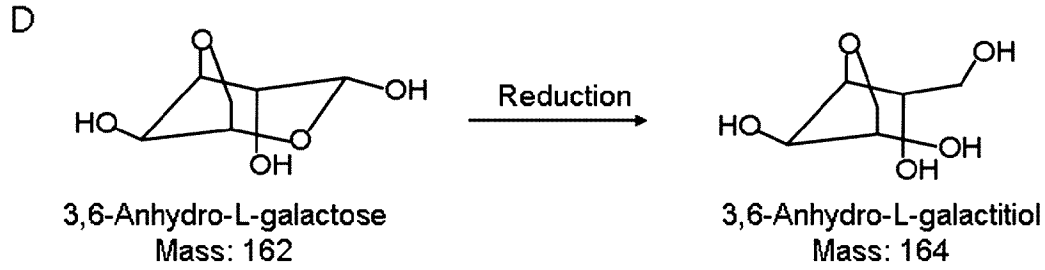
[도1b]


B
OH
OH
O
HO
OH
OH
Reduction
Agarobiose
Mass : 324
Agarobititol
Mass : 326

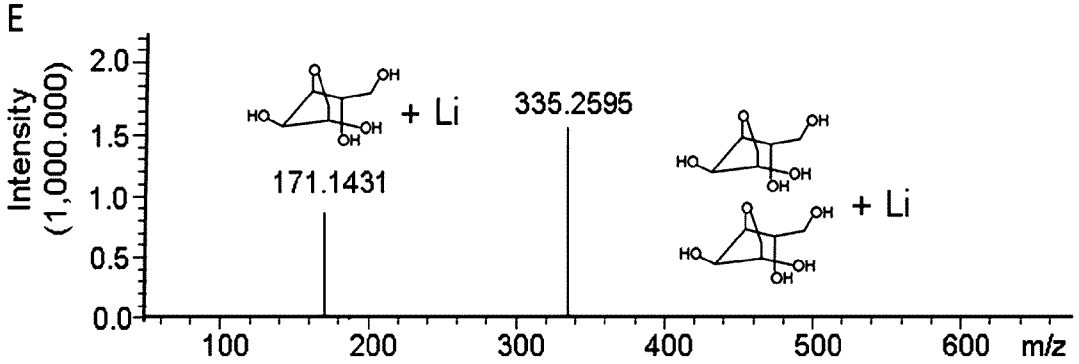
[도1c]


C
171.1330
169.1192
+ Li
- H2O + Li
333.2397
+ Li
Intensity (1,000.000)
Intensity (100.000)
m/z

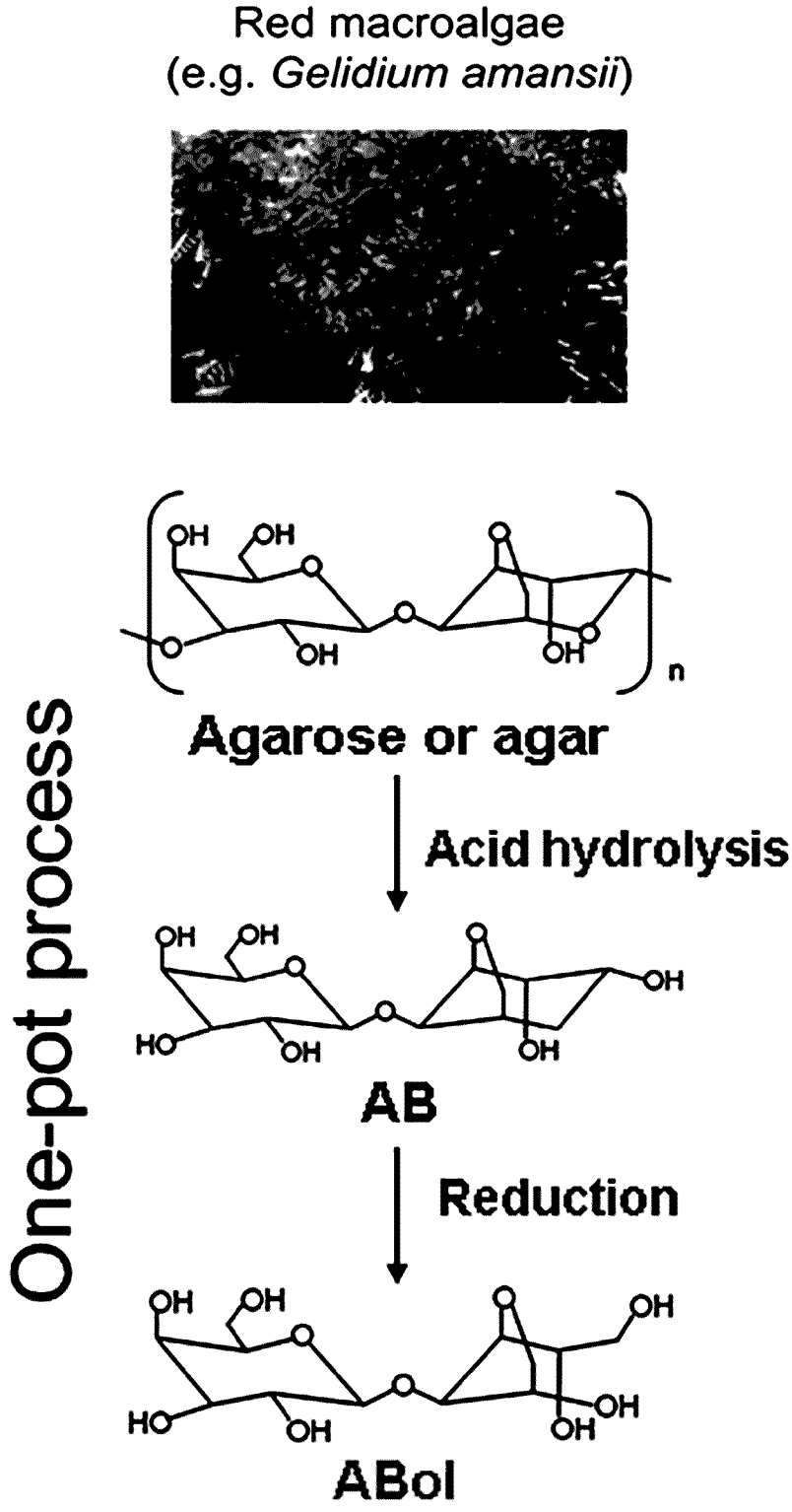
[도1d]


D
Reduction
3,6-Anhydro-L-galactose
Mass: 162
3,6-Anhydro-L-galactitiol
Mass: 164

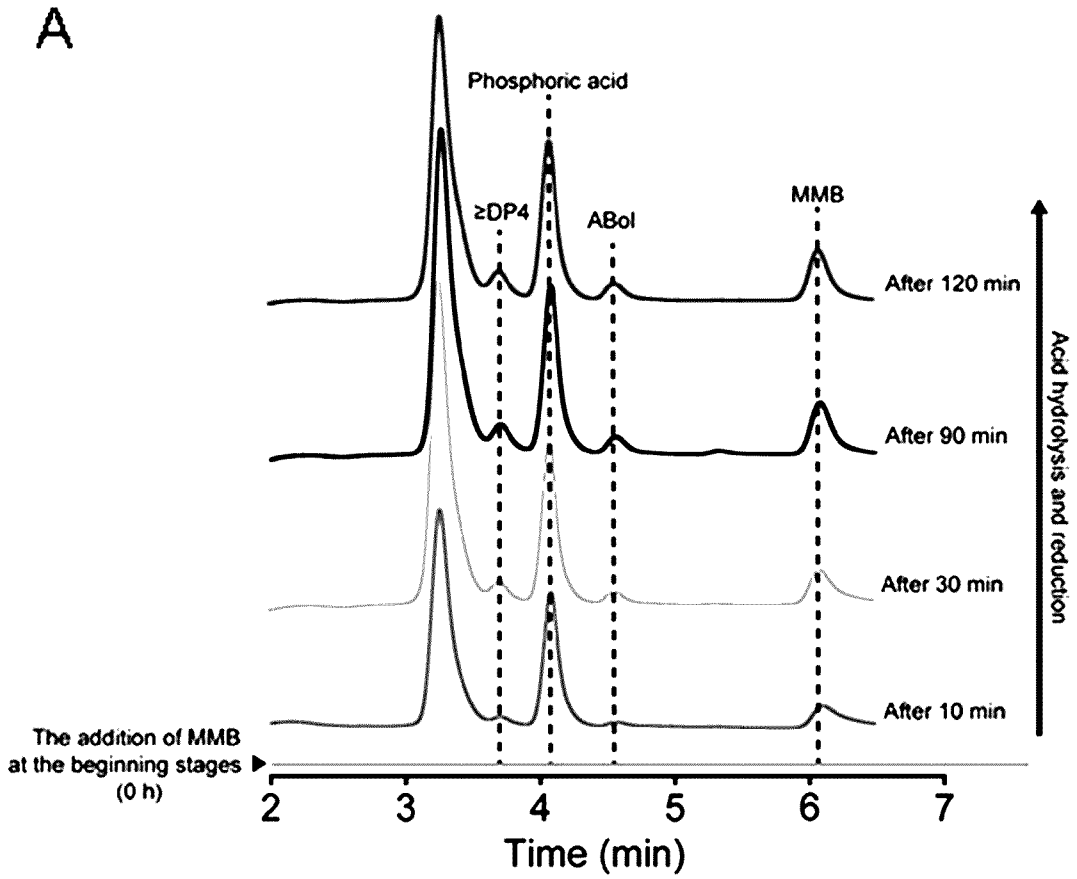
[도1e]


E
171.1431
+ Li
335.2595
+ Li
Intensity (1,000.000)
m/z

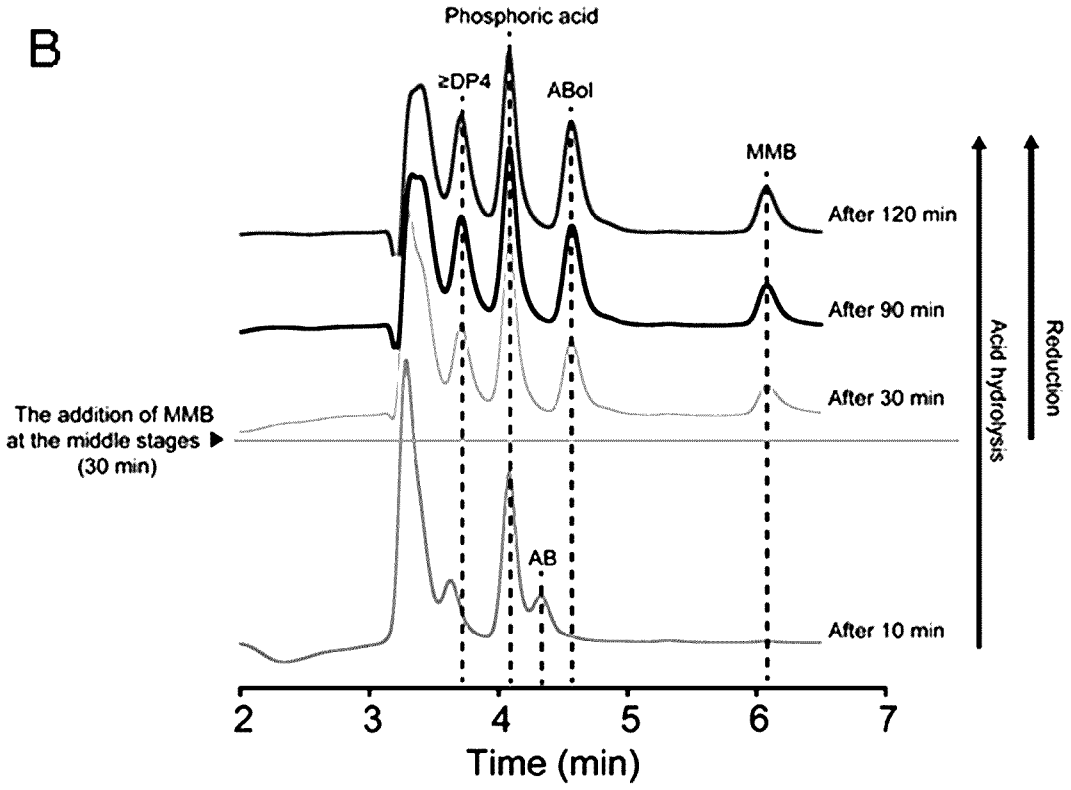
[도2]


Red macroalgae
(e.g. Gelidium amansii)
OH
OH
OH
OH
n
Agarose or agar
Acid hydrolysis
HO
AB
Reduction
ABol
One-pot process

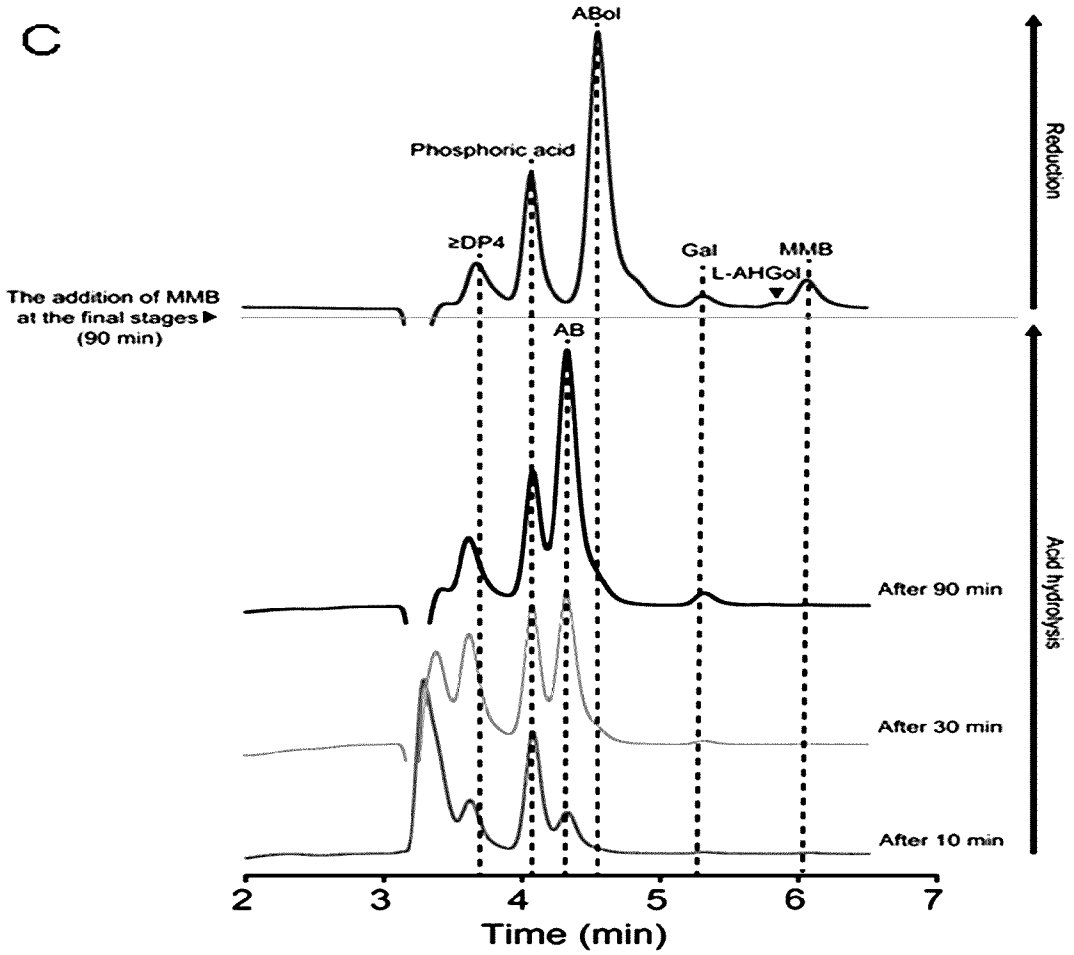
[도3a]


A
Phosphoric acid
≥DP4
ABol
MMB
After 120 min
After 90 min
After 30 min
After 10 min
Acid hydrolysis and reduction
The addition of MMB
at the beginning stages
(0 h)
2
3
4
5
6
7
Time (min)

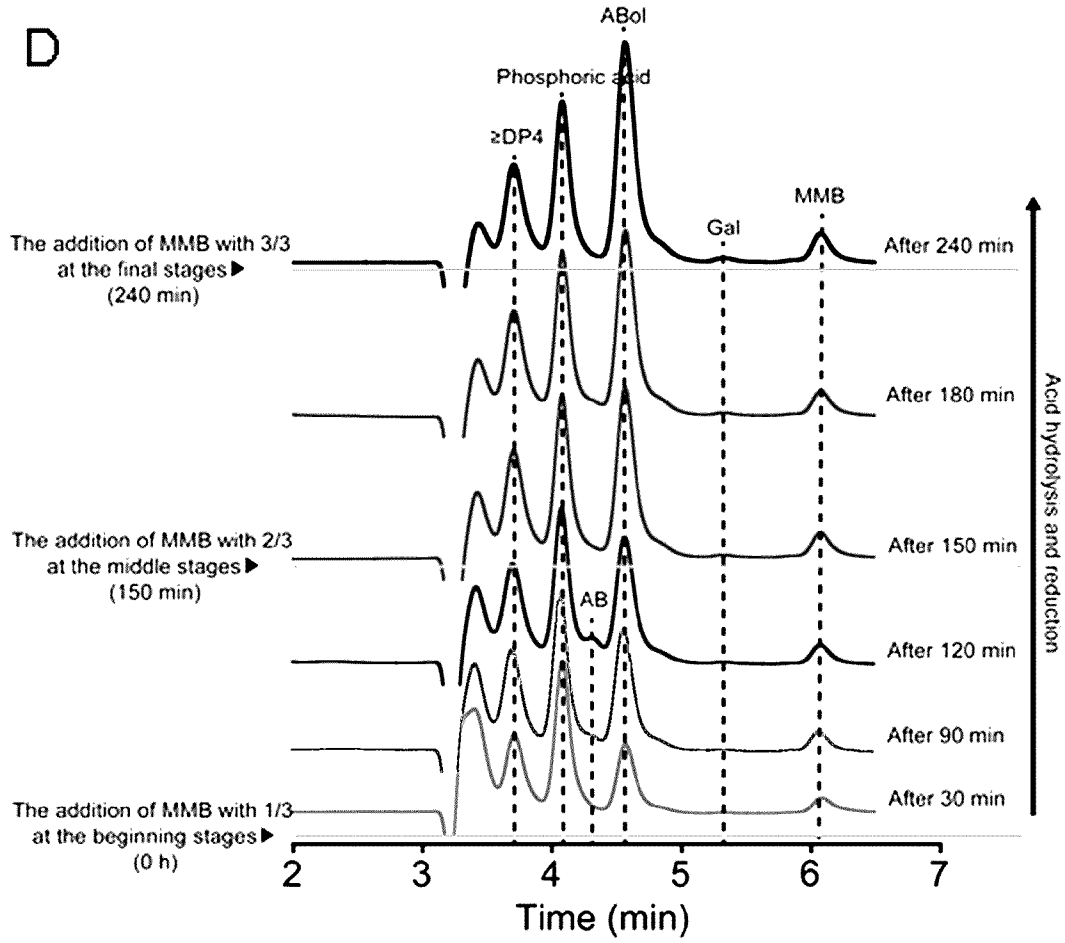
[도3b]


B
Phosphoric acid
≥DP4
ABol
MMB
After 120 min
After 90 min
After 30 min
After 10 min
AB
Acid hydrolysis
Reduction
The addition of MMB
at the middle stages
(30 min)
2
3
4
5
6
7
Time (min)

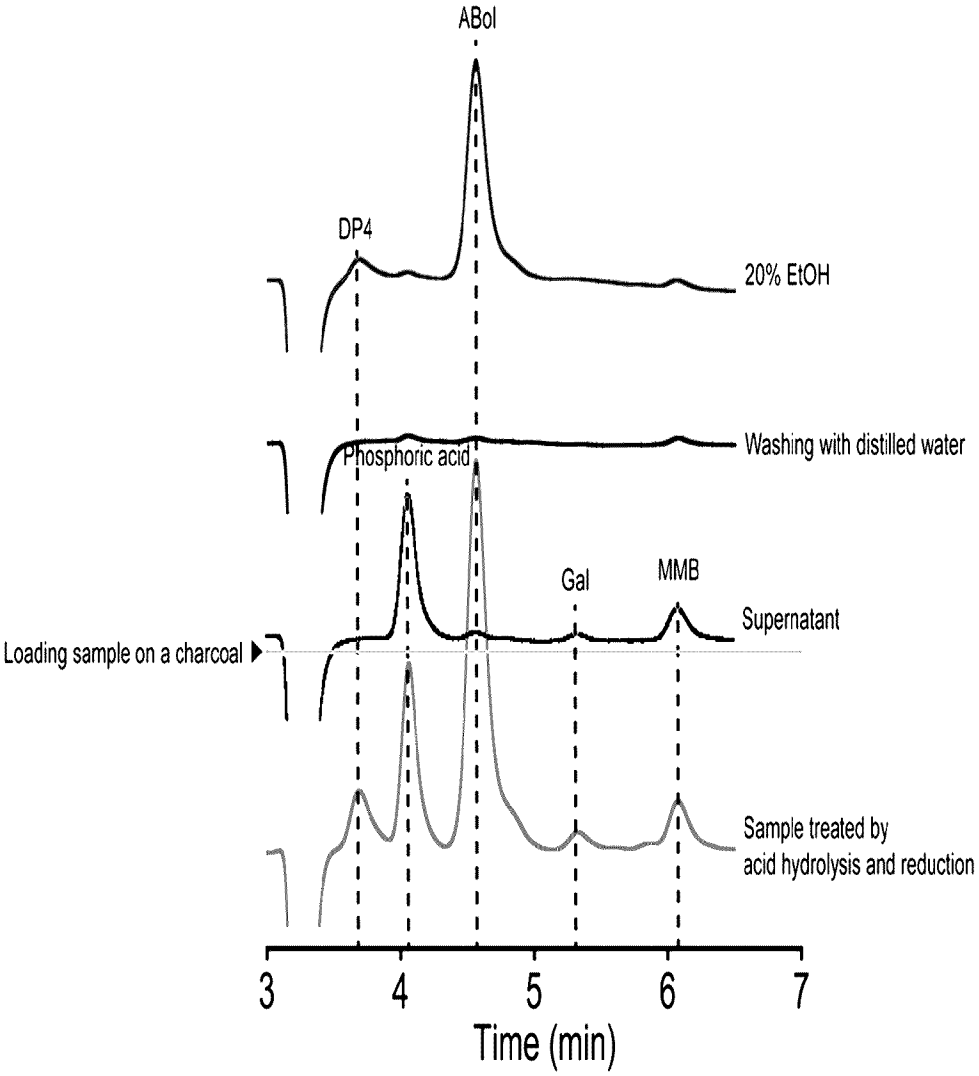
[도3c]


C
ABol
Phosphoric acid
≥DP4
Gal
MMB
L-AHGol
Reduction
The addition of MMB
at the final stages ▶
(90 min)
AB
After 90 min
After 30 min
After 10 min
Acid hydrolysis
2
3
4
5
6
7
Time (min)

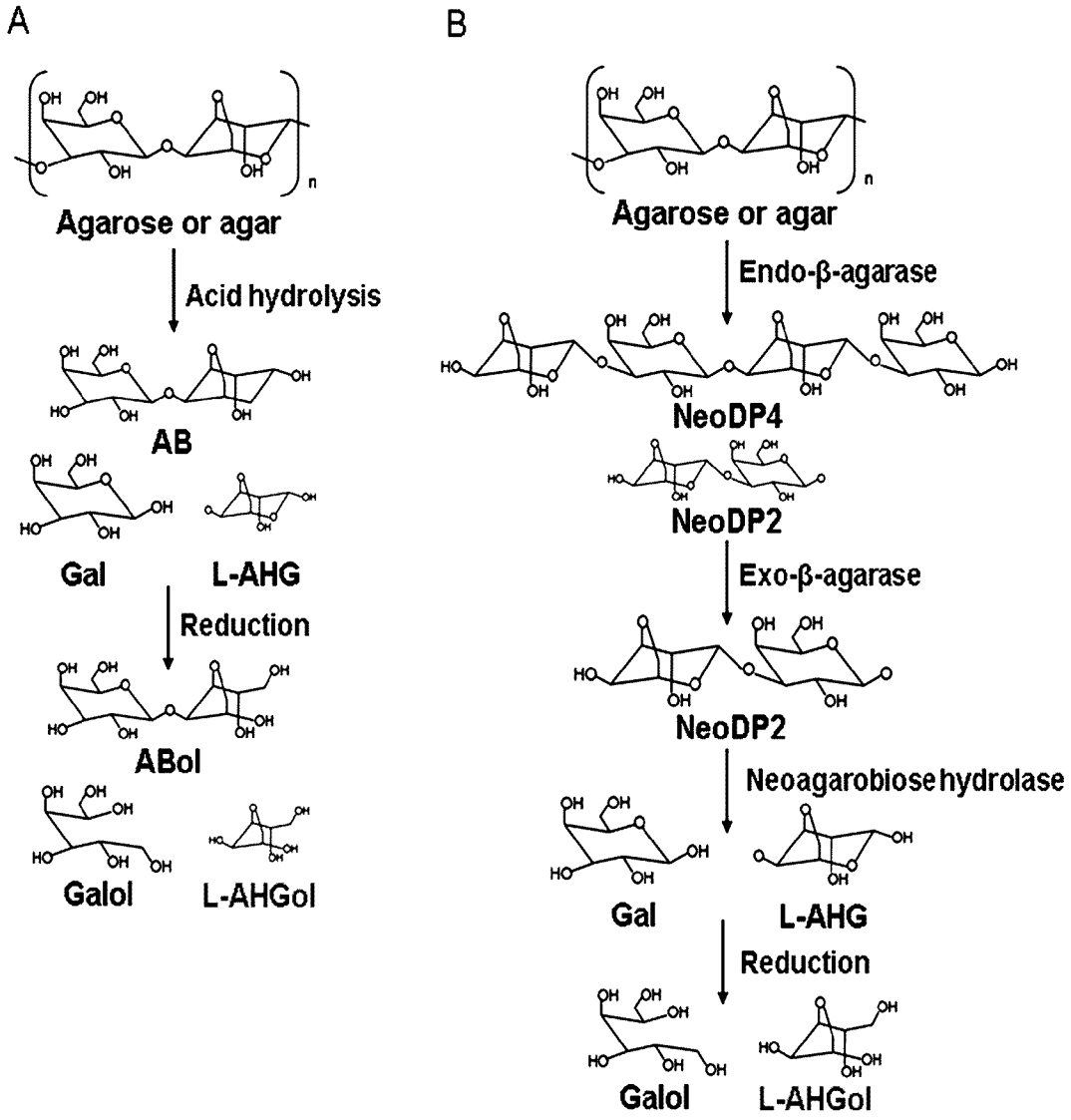
[도3d]


D
ABol
Phosphoric acid
≥DP4
MMB
Gal
The addition of MMB with 3/3
at the final stages ▶
(240 min)
After 240 min
After 180 min
The addition of MMB with 2/3
at the middle stages ▶
(150 min)
After 150 min
AB
After 120 min
After 90 min
The addition of MMB with 1/3
at the beginning stages ▶
(0 h)
After 30 min
Acid hydrolysis and reduction
2
3
4
5
6
7
Time (min)

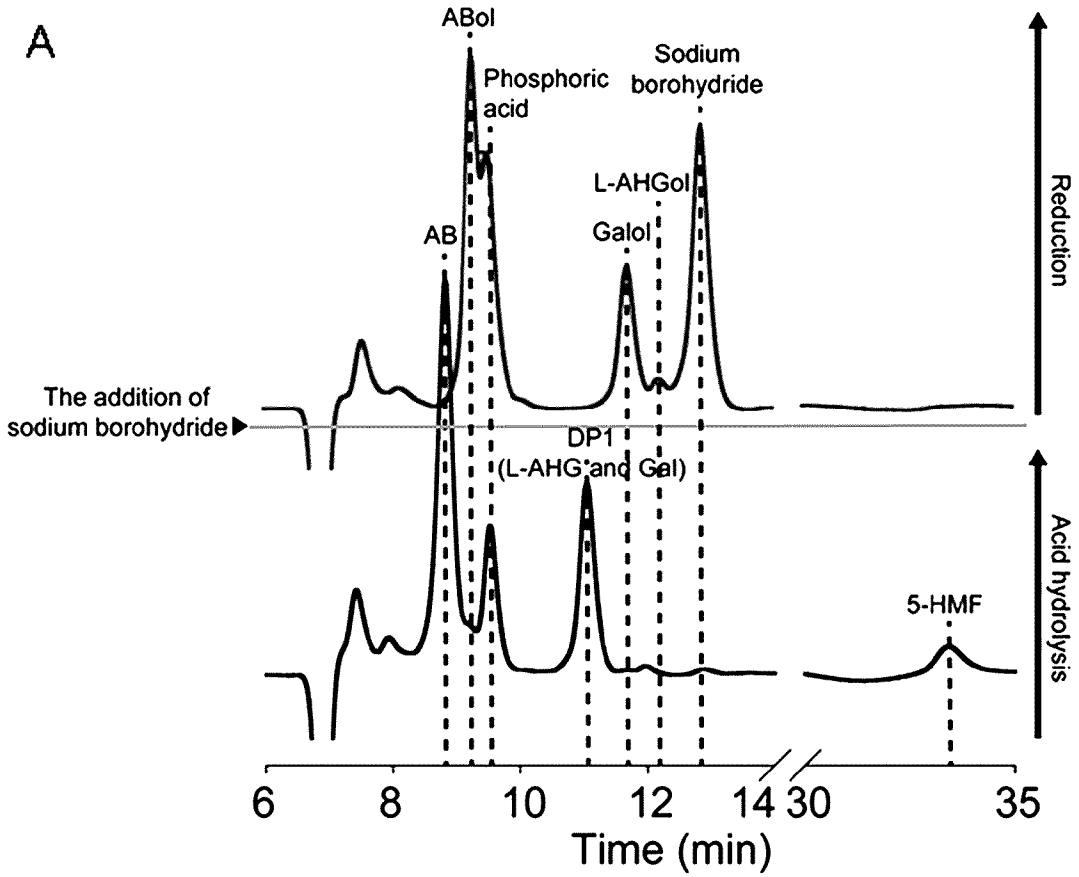
[도4]


ABol
DP4
20% EtOH
Washing with distilled water
Phosphoric acid
Gal
MMB
Supernatant
Loading sample on a charcoal
Sample treated by
acid hydrolysis and reduction
3
4
5
6
7
Time (min)

[도5]

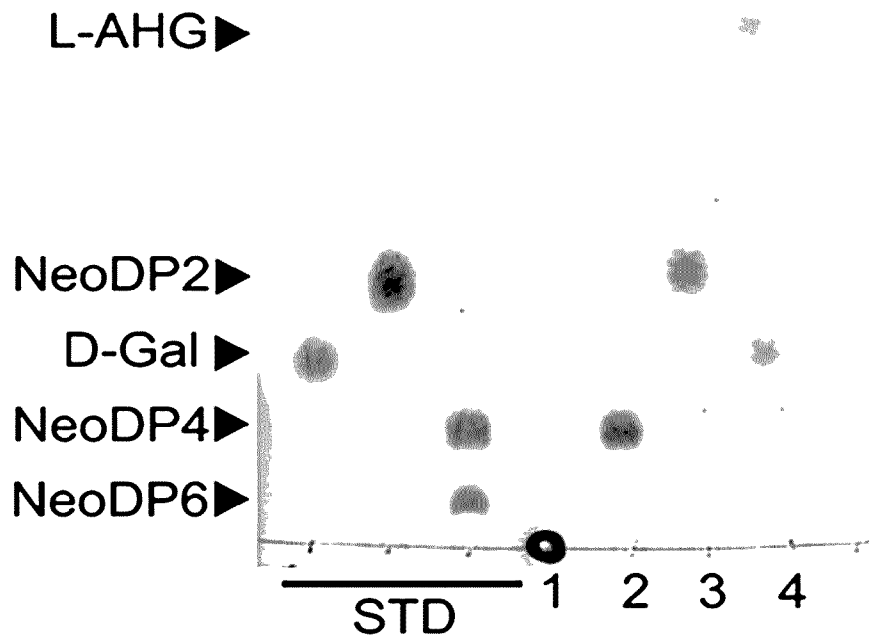

A
Agarose or agar
Acid hydrolysis
AB
Gal
L-AHG
Reduction
ABol
Galol
L-AHGol
B
Agarose or agar
Endo-β-agarase
NeoDP4
NeoDP2
Exo-β-agarase
NeoDP2
Neoagarobiose hydrolase
Gal
L-AHG
Reduction
Galol
L-AHGol

[도6a]


A
ABol
Phosphoric acid
Sodium borohydride
L-AHGol
AB
Galol
Reduction
The addition of sodium borohydride
DP1
(L-AHG and Gal)
5-HMF
Acid hydrolysis
6
8
10
12
14
30
35
Time (min)

[도6b]

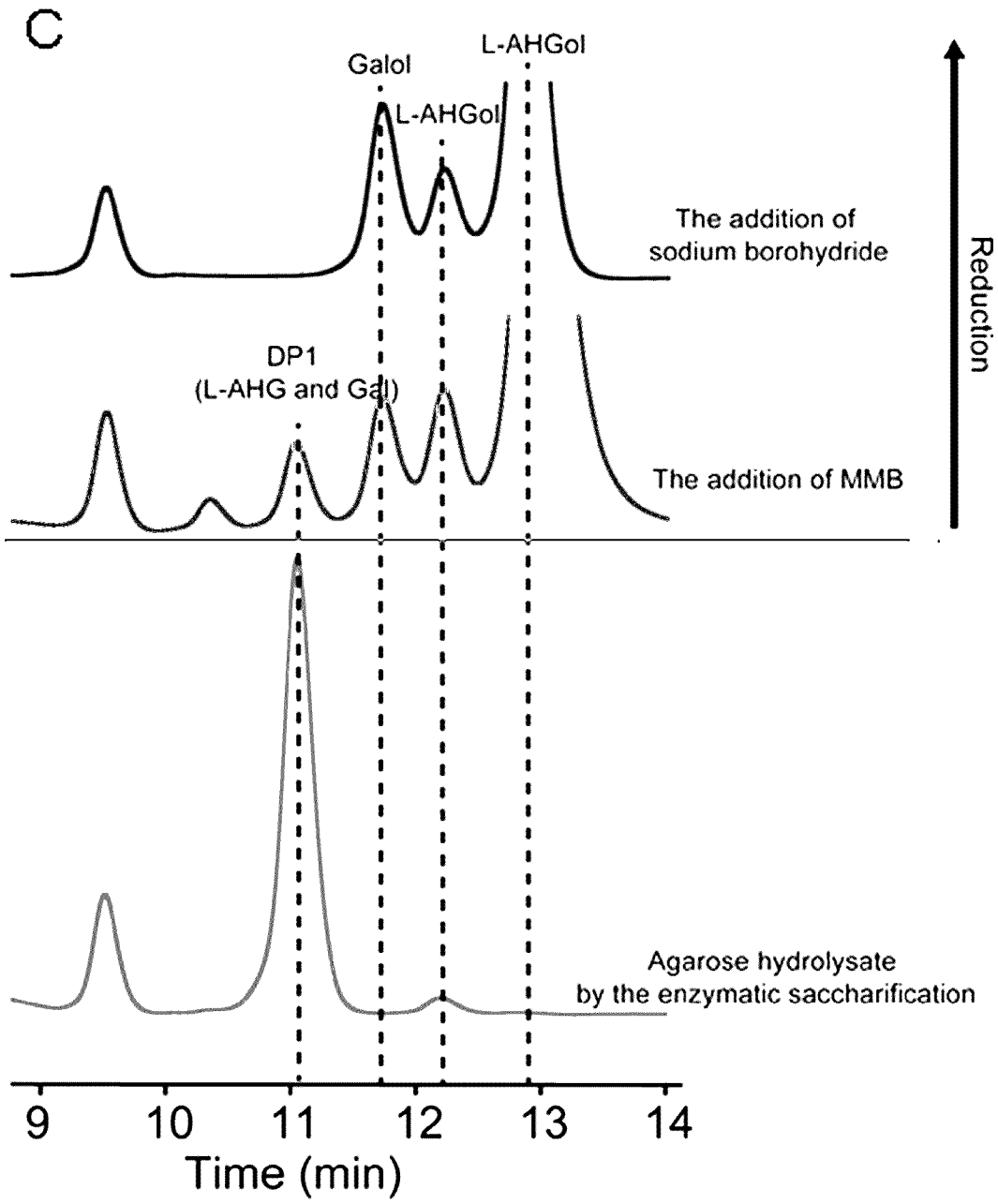
B



All reactions were performed sequentially.

1. Agarose
2. BpGH16A reaction products
3. Aga50D reaction products
4. SdNABH reaction products

[도6c]


C
Galol
L-AHGol
L-AHGol
The addition of
sodium borohydride
Reduction
DP1
(L-AHG and Gal)
The addition of MMB
Agarose hydrolysate
by the enzymatic saccharification
9
10
11
12
13
14
Time (min)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/011509

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 17/04(2006.01)i, C07H 1/00(2006.01)i, C07D 307/20(2006.01)i, C12P 17/04(2006.01)i, C12P 19/02(2006.01)i, C12P 19/14(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)

C07H 17/04; C12P 19/02; C12P 19/12; C07H 1/00; C07D 307/20; C12P 17/04; C12P 19/14

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: agar, agarose, hydrolysis, reducing agent, agaro biose, 3,6-anhydro-L-galactose, agarobititol, 3,6-anhydro-L-galactitol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DY	KR 10-1864800 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 07 June 2018 See claim 5; example 1.	1-3
Y	ABDEL-AKHER, M. et al. The Reduction of Sugars with Sodium Borohydride. J. Am. Chem. Soc. 1951, vol. 73, no. 10, pages 4691-4692 See page 4691, right column-page 4692, left column; table 1.	1-8
Y	YUN, E. J. et al. Production of 3,6-anhydro-l-galactose from agarose by agarolytic enzymes of Saccharophagus degradans 2-40. Process Biochemistry. 2011, vol. 46, no. 1, pages 88-93 See page 91, right column.	4-8
Y	HEHEMANN, J.-H. et al. Bacteria of the human gut microbiome catabolize red seaweed glycans with carbohydrate-active enzyme updates from extrinsic microbes. PNAS. 27 November 2012, vol. 109, no. 48, pages 19786-19791 See page 19788, right column; figure 2.	5-6
Y	NCBI. GenBank accession no. WP_007560915.1. beta-agarase [Bacteroides plebeius]. 22 March 2015 See the entire document.	6

☒ 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	Date of mailing of the international search report
10 JANUARY 2020 (10.01.2020)	**10 JANUARY 2020 (10.01.2020)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
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	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/011509

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NCBI. GenBank accession no. ABD81904.1. b-agarase [Saccharophagus degradans 2-40]. 10 February 2014 See the entire document.	6
Y	NCBI. GenBank accession no. WP_011469134.1. glycosylhydrolase [Saccharophagus degradans]. 24 May 2013 See the entire document.	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/011509

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1864800 B1	07/06/2018	CN 110291203 A	27/09/2019
		WO 2018-105932 A1	14/06/2018

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/011509

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07H 17/04(2006.01)i, C07H 1/00(2006.01)i, C07D 307/20(2006.01)i, C12P 17/04(2006.01)i, C12P 19/02(2006.01)i, C12P 19/14(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07H 17/04; C12P 19/02; C12P 19/12; C07H 1/00; C07D 307/20; C12P 17/04; C12P 19/14

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: 아가(agar), 아가로스(agarose), 가수분해(hydrolysis), 환원제(reducing agent), 아가로바이오스(agarobiose), 3,6-안하이드로-L갈락토오스(3,6-anhydro-L-glactose), 아가로바이티톨(agarobititol), 3,6-안하이드로-L갈락티톨(3,6-anhydro-L-glactitol)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DY	KR 10-1864800 B1 (고려대학교 산학협력단) 2018.06.07 청구항 5; 실시예 1	1-3
Y	ABDEL-AKHER, M. 등, "The Reduction of Sugars with Sodium Borohydride", J. Am. Chem. Soc. 1951, 73권, 10호, 페이지 4691-4692 페이지 4691, 우측 칼럼 - 페이지 4692, 좌측 칼럼; 표 1	1-8
Y	YUN, E. J. 등, "Production of 3,6-anhydro-l-galactose from agarose by agarolytic enzymes of Saccharophagus degradans 2-40", Process Biochemistry, 2011, 46권, 1호, 페이지 88-93 페이지 91, 우측 칼럼	4-8
Y	HEHEMANN, J.-H. 등, "Bacteria of the human gut microbiome catabolize red seaweed glycans with carbohydrate-active enzyme updates from extrinsic microbes", PNAS, 2012.11.27, 109권, 48호, 페이지 19786-19791 페이지 19788, 우측 칼럼; 도면 2	5-6
Y	NCBI, GenBank accession no. WP_007560915.1, "beta-agarase [Bacteroides plebeius]" 2015.03.22 전체 문헌	6

☒ 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

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

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

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 01월 10일 (10.01.2020)	2020년 01월 10일 (10.01.2020)

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

심사관
권용경
전화번호 +82-42-481-3371

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/011509

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	NCBI, GenBank accession no. ABD81904.1, "b-agarase [Saccharophagus degradans 2-40]" 2014.02.10 전체 문헌	6
Y	NCBI, GenBank accession no. WP_011469134.1, "glycosyhydrolase [Saccharophagus degradans]" 2013.05.24 전체 문헌	6

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/011509

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1864800 B1	2018/06/07	CN 110291203 A	2019/09/27
		WO 2018-105932 A1	2018/06/14