

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 11월 29일 (29.11.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/161360 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12P 19/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/003810
- (22) 국제출원일: 2011년 5월 24일 (24.05.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0049266 2011년 5월 24일 (24.05.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국
생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE
OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)
[KR/KR]; 대전시 유성구 과학로 111, 305-806 Daejeon
(KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 윤정훈 (YOON, Jung-
Hoon) [KR/KR]; 대전시 유성구 과학로 111, 305-806
Daejeon (KR). 오기훈 (OH, Ki Hoon) [KR/KR]; 대전시
유성구 과학로 111, 305-806 Daejeon (KR). 박수연
(PARK, Soo Yeon) [KR/KR]; 대전시 유성구 과학로
111, 305-806 Daejeon (KR). 이미화 (LEE, Mi Hwa)
[KR/KR]; 대전시 유성구 과학로 111, 305-806 Daejeon
(KR). 강철형 (KANG, Chul Hyung) [KR/KR]; 대전시

유성구 과학로 111, 305-806 Daejeon (KR). 오태광
(OH, Tae Kwang) [KR/KR]; 대전시 유성구 과학로
111, 305-806 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 서울시 강남구 역삼
동 642-16 성지하이츠 2차 8층, 135-080 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE,
PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

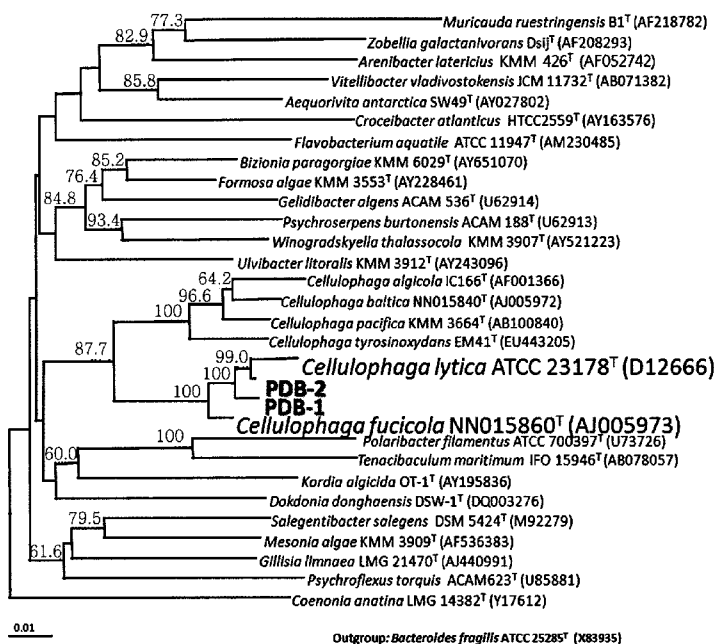
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL CELLULOPHAGA SP. STRAIN HAVING A DEGRADATIVE EFFECT ON POLYSACCHARIDES AND
USE OF SAME

(54) 발명의 명칭: 신규한 다당류 분해활성을 갖는 셀룰로파가 속 균주 및 이의 용도

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a novel *Cellulophaga sp.* strain having a degradative effect on polysaccharides. More particularly, a sample is collected from the seawater, the tidal mudflat, and the seashore in the region of the southern coast of Korea, and microorganisms are separated. Microorganisms that are capable of degrading carboxymethyl cellulose (CMC) are selected. Said microorganisms are confirmed through 16S rRNA analysis as being a novel *Cellulophaga sp.* strain. Said strain and the supernatant liquid obtained after culturing same are confirmed to have a degradative effect on various polysaccharides.

(57) 요약서: 본 발명은 다당류 분해 활성을 갖는 신규한 셀룰로파가(*Cellulophaga sp.*) 속 균주에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 남해 지역의 해수, 갯벌, 해안가에서 시료를 채취하여 미생물을 분리한 후, 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)를 분해할 수 있는 미생물을 선별하고, 16S rRNA 분석을 통해 상기 미생물이 셀룰로파가 속 신규한 균주임을 확인한 다음, 상기 균주 및 이의 배양 상층액이 다양한 다당류의 분해 활성을 가지는 것을 확인하였다.

WO 2012/161360 A1



공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13 의 2 에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13 의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규한 다당류 분해활성을 갖는 셀룰로파가 속 균주 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 다당류 분해 활성을 갖는 신규한 셀룰로파가(*Cellulophaga sp.*) 속 균주에 관한 것으로, 보다 상세하게는 해수, 갯벌, 해안가에서 분리한 다양한 다당류 분해 활성을 갖는 신규한 셀룰로파가 속 균주에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 바이오연료(biofuel)는 재생 가능하고 환경 친화적이다. 왜냐하면, 바이오연료는 이산화탄소 고정에 의한 광합성으로 생성되는 바이오매스(biomass)로부터 생산되기 때문이다. 특히 점점 줄어드는 화학 연료 공급에 대한 우려, 및 깨끗한 재생가능 에너지에 대한 요구로 인해 바이오연료에 대한 필요성은 증가하는 추세이다.
- [4] 현재 두 개의 바이오연료인 바이오알코올(바이오에탄올)과 바이오디젤이 각각 가솔린 및 디젤의 대안이 되는 연료로 제안되고 있으며 또한 사용되고 있다. 이들은 대기중 이산화탄소 방출 감소 및 지구 온난화에 긍정적인 효과를 줄 뿐만 아니라, 기존의 자동차의 시스템을 변화시키지 않고 사용될 수 있다. 바이오연료의 일례로는 목초, 건초 및 스위치그래스(*switchgrass*)와 같은 셀룰로오스 자원을 이용하여 바이오에탄올을 생산하고 있다. 최근에, 바이오에탄올의 매년 전세계 생산은 대략 10억 갤론으로 평가되고 있다. 이들 대부분은 기존의 정립된 시스템의 전분 및 당으로부터 생산되고 있다. 현재의 기술은 자연 상태에서 가장 풍부한 탄소원인 육상 식물로부터 유래된 다당류를 이용하여 바이오연료를 생산하는 것에 제한되고 있다. 특히, 육상 식물은 그 종류에 따라 차이는 있지만 자라는데 시간이 걸리고 기후 조건의 변화에 쉽게 반응한다. 따라서, 육상 식물로부터 유래된 다당류를 바이오연료를 생산에 상용하는 것은 한계가 있다.
- [5] 수생에서 서식하는 해조류는 포자에 의한 무성 생식 방법과 배우자에 의한 유성 생식 방법을 통하여 증식한다. 이들은 적절한 조건이 갖추어지면 육상 식물에 비해 더 빠른 속도로 증식할 수 있다. 또한, 이들은 지구의 70% 이상을 차지하는 바다 속에서 서식하고 있어 그 공급 가능성도 크다. 따라서, 빠른 속도로 증식할 수 있고 육상 식물에 비해 넓은 재배 면적을 갖는 해조류로부터 유래된 세포 외 다당류는 육상 식물로부터 유래된 다당류에 비해 바이오연료를 생산하는데 더 높은 효율을 제공할 수 있을 것이다.
- [6]
- [7] 셀룰로스를 β -(1, 4)-결합의 D-포도당 유닛으로 구성된 다당류를 말한다. 이는

식물 세포벽에서 주요한 구성요소이자 지구상에 존재하는 가장 풍부한 탄소원이기도 하다. 미생물에 의해 셀룰로스를 분해한다는 것은 지구 탄소 재활용에 있어 중요한 사안이다. 셀룰로스 분해 미생물들은 엔도글루카나아제, 엑소글루카나아제, 베타-글루코시다아제, 및 보조적 효소들을 생산함으로써 셀룰로스의 β -1,4-글루코시드 결합을 시너지 효과를 일으키며 포도당으로 효과적으로 분해한다. 이들 효소들은 종종 탄수화물 결합 도메인(carbohydrate binding domain; CBD)라고 칭해지는 부속적 모듈을 포함한다. CBD의 주 역할은 셀룰라아제의 촉매적 도메인을 좀 더 근접하게 셀룰로스 표면으로 이송함으로써 효과적 가수분해를 일으키는 데에 있다.

- [8] 현재, 셀룰라아제가 동물 사료, 섬유, 폐기물 처리 및 양조 산업에서 광범위하게 사용되고 있다(Beguin, 1983; Mandels, 1985). 또한, 셀룰로스 바이오매스를 셀룰라아제에 의해 분해함으로써 얻어지는 포도당을 이용한 발효를 통한 에탄올 및 부탄올과 같은 생물연료는 점차적으로 매력적인 지속적이자 대안적 에너지원으로 간주되고 있다. 따라서, 셀룰라아제를 이용한 효과적 셀룰로스 분해가 셀룰로스 바이오매스의 사용에 있어 중요한 이슈가 되는 것이다. 퇴비 토양, 부패 식물재료, 하수도 찌꺼기, 반추류의 분변 및 극심한 환경 등과 같은 다양한 소스에서 곰팡이 및 세균에 의해 생성된 셀룰로스 분해 효소 다량을 분리하여 특성화했다(Blumer-Schuette et al., 2008; Doi, 2008; Maki et al., 2009; Viikari et al., 2007). 그러나, 해양 세균에서 얻어지는 셀룰로스 분해 시스템에 대해서는 상대적으로 연구된 수가 적은 편이다(Ekberg et al., 2007; Fu et al., 2010; Gao et al., 2010; Hirasawa et al., 2006; Ryu et al., 2001; Shanmughapriya et al., 2010; Taylor et al., 2006; Yin et al., 2010; Zeng et al., 2006). 최근 들어, *Saccharophagus degradans* 2-20^T 및 *Teredinibacter turnerae* T7902^T에 대해 보고된바 있다(Taylor et al., 2006; Yang et al., 2009). *S.degradans* 2-20^T 및 *T.turnerae* T7902^T은 다중 엔도글루카나아제 및 엑소글루카나아제와 함께 기타 해조류(marine algae and plants)의 다당류 분해 시스템을 보유한다. 따라서, 해양 세균류가 신규한 셀룰로스 바이오매스 분해 시스템을 위해 풍부한 소스가 될 것으로 보인다.

[9]

- [10] 이에, 본 발명자들은 해조류 및 식물 유래 다당류를 분해할 수 있는 신규 미생물을 선별하기 위하여, 다양한 시료를 채취하여 미생물을 분리한 후, 카로복시메틸 셀룰로오즈(carboxymethyl cellulose; CMC)를 분해할 수 있는 미생물을 선별하고, 16S rRNA 분석을 통해 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속에 속하는 신규한 미생물임을 확인한 다음, 상기 신규한 미생물이 다양한 다당류 효과적으로 분해할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명의 목적은 다당류 분해 활성을 가지는 신규한 균주, 상기 균주를 이용한 다당류 분해용 조성물 및 상기 균주를 이용한 다당류 분해하는 방법을 제공한다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다당류 분해 활성을 갖는 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속 균주를 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 다당류 분해 활성을 갖는 셀룰로파가 속 균주 및 이의 배양 상층액을 포함하는 다당류 분해용 조성물을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 다당류 분해 활성을 갖는 셀룰로파가 속 균주 및 이의 배양 상층액을 포함하는 바이오 에탄올 생산용 조성물을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 다당류 분해 활성을 갖는 셀룰로파가 속 균주 및 이의 배양 상층액을 다당류에 접촉시키는 단계를 포함하는 다당류 분해 방법을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은

[19] 1) 바이오매스로부터 다당류를 분리하는 단계;

[20] 2) 단계 1)의 다당류에 제 1항 또는 제 2항의 균주, 또는 이의 배양 상층액을 접촉시켜 단당류를 생성시키는 단계; 및

[21] 3) 단계 2)의 단당류를 미생물에 의해 발효시키는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 제조방법을 제공한다.

[22] 또한, 본 발명은 다당류 분해용 조성물로 사용하기 위한 셀룰로파가 속 균주 및 이의 배양 상층액을 제공한다.

[23] 아울러, 본 발명은 바이오 에탄올 생산용 조성물로 사용하기 위한 셀룰로파가 속 균주 및 이의 배양 상층액을 제공한다.

[24]

[25] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[26]

[27] 본 발명은 수탁번호 KCTC11940BP *Cellulophaga* sp. PDB-1로 기탁된 다당류 분해 활성을 갖는 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속 균주를 제공한다.

[28] 또한, 본 발명은 수탁번호 KCTC11941BP *Cellulophaga* sp. PDB-2로 기탁된 다당류 분해 활성을 갖는 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속 균주를 제공한다.

[29] 상기 다당류는 아가로즈, 카라기난, 전분, 풀루란, 카르복시메틸셀룰로오즈(carboxymethylcellulose; CMC), 자일란, 라미나린, 키틴 및 펙틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[30]

[31] 본 발명의 한가지 실시태양에서 본 발명자들은 다당류를 분해하는 미생물을 분리하기 위하여, 남해지역의 해수, 갯벌 및 해안가에서 시료를 채취하여 미생물을 분리한 후, 카르복시메틸 셀룰로오즈(carboxymethyl cellulose; CMC)를

분해할 수 있는 미생물을 선별하였다.

[32] 또한, 본 발명의 한가지 실시태양에서 본 발명자들은 상기 선별된 미생물을 동정하기 위하여, 16S rRNA 유전자의 시퀀싱과 계통발생학적 분석을 수행한 결과, 이들 미생물들이 서열번호: 1 및 서열번호 2로 나타낸 바와 같이 *C. lytica* ATCC 23178^T 및 *C. fucicola* NN015860^T 에 일관된 클러스터를 형성하는 *Cellulophaga*(셀룰로파가) 속을 포함하는 클레이드(clade)의 분류에 해당함을 확인하였다(도 2 참조).

[33] 또한, 본 발명의 한가지 실시태양에서 본 발명자들은 상기 선별된 미생물의 셀룰로스 분해활성을 확인하기 위하여 CMC로 SDS-PAGE에 대한 자이모그램 분석을 수행한 결과, 상기 미생물은 셀룰로스 분해 효소를 가지는 것을 확인하였다(도 2 참조).

[34] 또한, 본 발명의 한가지 실시태양에서 본 발명자들은 PDB-1의 35 kDa 단백질의 N-말단 시퀀싱을 수행한 결과, 35 kDa 단백질의 N-말단 시퀀스는 기타 공지된 셀룰로스 분해 효소와 매칭되지 않는 것을 확인하였다.

[35] 또한, 본 발명의 한가지 실시태양에서 본 발명자들은 PDB-1의 분비 단백질의 분해 활성 분석하기 위하여 PDB-1의 분비 단백질의 셀룰로스 분해 활성을 확인한 결과, PDB-1의 분비 단백질은 CMC를 잘 가수분해하는 반면, 결정체 기질(substrate)는 효과적으로 가수분해할 수 없었다. 이를 통해 이들 효소가 셀룰로스의 비결정질 부위의 β -1,4 결합에 더욱 활성을 보임을 확인하였다(표 1 참조).

[36] 또한, 본 발명의 한가지 실시태양에서 본 발명자들은 셀룰로파가 PDB-1 및 PDB-2의 다당류 분해 활성 확인하기 위하여, 다당류를 포함하는 최소 배지 배양액 하에서 배양 후, 세포 외로 분비된 단백질의 다당류 분해능력을 확인한 결과, PDB-1 및 PDB-2는 아가로즈, 카라기난, 전분, 풀루란, CMC, 자일란, 라미나린, 키틴, 펙틴과 같은 다양한 다당류의 분해시스템을 갖고 있음을 확인하였다(도 3 내지 도 8 참조).

[37] 따라서, 상기 다양한 다당류에 대한 분해 활성을 가진 신규한 미생물을 셀룰로파가 속으로 동정하고, *Cellulophaga* sp. PDB-1 및 *Cellulophaga* sp. PDB-2으로 명명하였으며 2011년 05월 24일에 한국생명공학연구원(KRIBB) 생물자원관리본부(KBRC) 미생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다.(기탁번호: KCTC11940BP 및 KCTC11941BP).

[38]

[39] 또한, 본 발명은 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액을 포함하는 다당류 분해용 조성물을 제공한다.

[40]

[41] 본 발명의 한가지 실시태양에서 본 발명자들은 PDB-1의 분비 단백질의 분해 활성 분석하기 위하여 PDB-1의 분비 단백질의 셀룰로스 분해 활성을 확인한 결과, PDB-1의 분비 단백질은 CMC를 잘 가수분해하는 반면, 결정체

기질(substrate)은 효과적으로 가수분해할 수 없었다. 이를 통해 이들 효소가 셀룰로스의 비결정질 부위의 β -1,4 결합에 더욱 활성을 보임을 확인하였다(표 1 참조).

- [42] 또한, 본 발명의 한가지 실시태양에서 본 발명자들은 셀룰로파가 PDB-1 및 PDB-2의 다당류 분해 활성 확인하기 위하여, 다당류를 포함하는 최소 배지 배양액 하에서 배양 후, 세포 외로 분비된 단백질의 다당류 분해능력을 확인한 결과, PDB-1 및 PDB-2는 아가로스, 카라기난, 전분, 풀루란, CMC, 자일란, 라미나린, 키틴, 펙틴과 같은 다양한 다당류의 분해시스템을 갖고 있음을 확인하였다(도 3 내지 도 8 참조).
- [43] 따라서, 본 발명의 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액은 다양한 다당류에 대한 분해 활성을 가지므로 다당류 분해용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.
- [44]
- [45] 또한, 본 발명은 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액을 포함하는 다당류에 접촉시키는 단계를 포함하는 다당류 분해 방법을 제공한다.
- [46] 상기 다당류를 접촉시키는 단계는 다당류와 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액을 55°C-85°C, 바람직하게는 65°C에서, pH 5.0 내지 5.5 또는 7.5 내지 8.0에서 10-30분 동안 접촉시키는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [47] 본 발명의 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액은 다양한 다당류에 대한 분해 활성을 가지므로 다당류에 접촉시키는 단계를 포함하는 다당류 분해 방법으로 이용될 수 있다.
- [48]
- [49] 또한, 본 발명은 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액을 포함하는 바이오 에탄올 생산용 조성물을 제공한다.
- [50] 상기 바이오 에탄올은 하기의 방법으로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [51] 1) 바이오매스로부터 다당류를 분리하는 단계;
- [52] 2) 단계 1)의 다당류에 제 1항 또는 제 2항의 균주, 또는 이의 배양 상층액을 접촉시켜 단당류를 생성시키는 단계; 및
- [53] 3) 단계 2)의 단당류를 미생물에 의해 발효시키는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 제조방법을 제공한다.
- [54] 상기 바이오매스는 다당류를 포함하는 벼짚, 보릿짚, 고구마 줄기, 유채줄기, 카사바 줄기의 농업 부산물, 폐지, 플러프의 고체 쓰레기, 간벌목, 폐목재, 가공 부산물의 목재, 담조류, 해조류의 수상 식물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [55] 상기 단계 1)의 다당류는 아가로스, 카라기난, 전분, 풀루란, 카르복시메틸셀룰로오스, 자일란, 라미나린, 키틴 및 펙틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [56] 상기 단계 3)의 미생물은 사카로마이세스 세레비시애, 사르시나 벤트리쿨리,

클루이베로마이세스 프라질리스, 자이코모모나스 모빌리스, 클루이베로마이세스 막시아너스 IMB3, 브레타노마이세스 쿠스테르시이, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰, 클로스트리디움 바이에링키, 클로스트리디움 아우란티부틸리쿰 및 클로스트리디움 데타노모르폼으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[57] 본 발명의 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액은 다양한 다당류에 대한 분해 활성을 가지므로 이러한 분해를 통해 생성된 다당류 분해 생성물에 바이오 연료를 생산할 수 있는 미생물을 반응시켜 효과적으로 바이오에탄올을 제조할 수 있다.

[58]

[59] 또한, 본 발명은 다당류 분해용 조성물로 사용하기 위한, PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액을 제공한다.

[60] 본 발명의 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액은 다양한 다당류에 대한 분해 활성을 가지므로 다당류 분해용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[61]

[62] 아울러, 본 발명은 바이오 에탄올 생산용 조성물로 사용하기 위한, PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액을 제공한다.

[63] 본 발명의 PDB-1 및 PDB-2, 또는 이의 배양 상층액은 다양한 다당류에 대한 분해 활성을 가지므로 이러한 분해를 통해 생성된 다당류 분해 생성물에 바이오 연료를 생산할 수 있는 미생물을 반응시켜 효과적으로 바이오에탄올을 생산할 수 있으므로 바이오 에탄올 생산용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[64]

발명의 효과

[65] 본 발명의 목적은 다당류 분해 활성을 가지는 신규한 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속 균주에 관한 것으로, 남해 지역의 해수, 갯벌, 해안가에서 시료를 채취하여 미생물을 분리한 후, 카르복시메틸셀룰로오즈(CMC)를 분해할 수 있는 미생물을 선별하고, 16S rRNA 분석을 통해 상기 미생물이 셀룰로파가 속 신규한 균주임을 확인한 다음, 상기 균주 및 이의 배양 상층액이 다양한 다당류의 분해 활성을 가지는 것을 확인하였다.

[66]

도면의 간단한 설명

[67] 도 1은 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속 PDB-1 및 PDB-2의 16S rRNA의 계통도 분석을 나타낸 도이다. 16S rRNA 유전자에 따른 인접한 계통도가 기타 다른 관련된 분류군들 사이에서 PDB-1 및 PDB-2의 위치를 보여준다. 분기점(branching point)에서 붓스트랩 값(bootstrap values)(1000 복제의 퍼센트로 표현됨) > 50 % 이 나타낸다. *Bacteroides fragilis* ATCC 25285T(GenBank accession number, X83935)를 외군비교(outgroup)로 사용했다. Scale bar, 0.01 substitutions

per nucleotide position.

- [68] 도 2는 셀룰로파가 속 PDB-1 및 PDB-2의 세포 외 셀룰라아제에 대한 CMC-SDA-PAGE 분석 및 자이코그래피를 나타낸 도이다;
- [69] 좌측 패널에는 60% 및 70 % 황산암모늄(ammonium sulfate)에서 침전된 단백질의 Coomassie Brilliant Blue R-250 염색된 0.1 % CMC를 통한 SDS-PAGE 분석을 나타낸다; 및
- [70] 우측 패널은 침전 단백질의 셀룰라아제 활성 염색에 대한 자이모그램(zymography)을 나타낸다.
- [71] Lanes: M: 분자무게 마커 단백질
- [72] 60은 60% 황산암모늄에서의 PDB-1 및 PDB-2의 침전된 세포 외 단백질;
- [73] 70은 70% 황산암모늄에서의 PDB-1 및 PDB-2의 침전된 세포 외 단백질; 및
- [74] 화살표는 N-말단 시퀀싱 수행을 수행한 35 kDa 단백질을 나타낸다.
- [75] 도 3은 셀룰로파가 속 PDB-1의 분비 단백질의 갈락탄(Galactan)분해능을 나타낸 도이다. x축은 배양액 상에 포함된 단당류 및 다당류를 나타낸 것이며, y축은 1 mL의 PDB-1의 분비 단백질을 포함하는 배양액 첨가 시 반응액 상에 포함된 다당류인 저온 용해성 아가로스(Agarose)와 카라기난(Carrageenan)으로부터 시간당 유리되는 환원당의 양을 나타낸 것이다.
- [76] 도 4는 셀룰로파가 속 PDB-1의 분비 단백질의 글루칸(Glucan)분해능을 나타낸 도이다. x축은 배양액 상에 포함된 단당류 및 다당류를 나타낸 것이며, y축은 1 mL의 PDB-1의 분비 단백질을 포함하는 배양액 첨가 시 반응액 상에 포함된 다당류인 전분(Starch), CMC, 라미나린(Laminarin), 풀루란(Pullulan)로부터 시간당 유리되는 환원당의 양을 나타낸 것이다.
- [77] 도 5는 셀룰로파가 속 PDB-1의 분비 단백질의 자일란과 다른 다당류들에 대한 분해능을 나타낸 도이다. x축은 배양액 상에 포함된 단당류 및 다당류를 나타낸 것이며, y축은 1 mL의 PDB-1의 분비 단백질을 포함하는 배양액 첨가 시 반응액상에 포함된 다당류인 자일란(xylan), 알긴산(Alginate), 콜로이드 키틴(Chitin), 펙틴(Pectin)으로부터 시간당 유리되는 환원당의 양을 나타낸 것이다.
- [78] 도 6은 셀룰로파가 속 PDB-2의 분비 단백질의 갈락탄(Galactan)분해능을 나타낸 도이다. x축은 배양액 상에 포함된 단당류 및 다당류를 나타낸 것이며, y축은 1 mL의 PDB-2의 분비 단백질을 포함하는 배양액 첨가 시 반응액상에 포함된 다당류인 저온 용해성 아가로스(Agarose)와 카라기난(Carrageenan)으로부터 시간당 유리되는 환원당의 양을 나타낸 것이다.
- [79] 도 7은 셀룰로파가 속 PDB-2의 분비 단백질의 글루칸(Glucan)분해능을 나타낸 도이다. x축은 배양액 상에 포함된 단당류 및 다당류를 나타낸 것이며, y축은 1 mL의 PDB-1의 분비 단백질을 포함하는 배양액 첨가 시 반응액상에 포함된 다당류인 전분(Starch), CMC, 라미나린(Laminarin), 풀루란(Pullulan)로부터 시간당 유리되는 환원당의 양을 나타낸 것이다.

[80] 도 8은 셀룰로파가 속 PDB-2의 분비 단백질의 자일란과 다른 다당류들에 대한 분해능을 나타낸 도이다. x축은 배양액 상에 포함된 단당류 및 다당류를 나타낸 것이며, y축은 1 mL의 PDB-1의 분비 단백질을 포함하는 배양액 첨가 시 반응액상에 포함된 다당류인 자일란(xylan), 알긴산(Alginate), 콜로이드 키틴(Chitin), 펙틴(Pectin)으로부터 시간당 유리되는 환원당의 양을 나타낸 것이다.

[81]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[82] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[83] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[84]

<실시예 1> 미생물의 분리

[86] 셀룰라아제(cellulase)를 생산하는 미생물을 분리하기 위해, 대한민국 거제도 남해 모래 해안에서 dilution plating 방법을 이용하여 Marine Agar 2216(MA; Difco, 미국)에서 성장하는 미생물을 분리하였다.

[87] 분리한 미생물 중 셀룰라아제를 생산하는 미생물을 선별하기 위하여, 카르복시메틸 셀룰로오즈(carboxymethyl cellulose; CMC)를 분해할 수 있는 미생물을 선별하였다.

[88] 구체적으로 상기 분리한 미생물은 CMC 한천배지(1.0%의 카르복시메틸 셀룰로스(Sigma, 미국)와 MA)상으로 찍어서 도말하는 방법으로 옮겨진 후, 3일 동안 25°C에서 배양한 후, 상기 플레이트들을 0.1% 콩고 레드(congo red) 용액으로 15분 동안 염색한 후, 1M NaCl으로 세척(Beguin, 1983)한 결과, 큰 헤일로(halos)를 나타내는 CMC 분해 활성(degrading activity)을 가진 두 종류의 균주를 선별하였다.

[89]

<실시예 2> 미생물의 동정

[91] 상기 <실시예 1>에서 선별된 미생물을 분류하기 위해, Yoon et al.에 기재된 방법에 따라, 분리된 박테리아에 대해 염색체 DNA 추출 및 정제를 수행하고, 이와 함께 RNase T1 102의 변형을 RNase A와 조합하여 사용함으로써 RNA에 의한 오염을 최소화했다(Yoon et al., 1996). 상기 언급한 두 개의 유니버설 프라이머(universal primers)를 사용하여 16S rRNA 유전자 증폭을 수행한 후(Yoon et al., 1998), Yoon et al.에 기재된 방법에 따라, 증폭된 16S rRNA 유전자의 시퀀싱과 계통발생학적 분석을 수행했다(Yoon et al., 2003).

[92] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 PDB-1 및 PDB-2의 16S rRNA에 대한 계통발생학적 분석에 따라, 이들 미생물들이 서열번호: 1 및 서열번호 2로 나타낸 바와 같이 *C. lytica* ATCC 23178^T 및 *C. fucicola* NN015860^T에 일관된

클러스터를 형성하는 *Cellulophaga*(셀룰로파가) 속을 포함하는 클레이드(clade)의 분류에 해당함을 확인하였다. 또한, 스트레인(strain) PDB-2는 스트레인 PDB-1, *C. fucicola* NN015860^T, 및 *C. lytica* ATCC 23178^T, 각각에 대해 16S rRNA 유전자 상동성 99.0, 98.5, 및 97.6%를 가지며, 다만 기타 다른 *Cellulophaga* 속에 대해서는 92.2 내지 93.6% 값을 갖는 것을 확인한 후(도 1), *Cellulophaga* sp. PDB-1 및 *Cellulophaga* sp. PDB-2으로 명명하였으며 2011년 05월 24일에 한국생명공학연구원(KRIBB) 생물자원관리본부(KBRC) 미생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다.(기탁번호: KCTC11940BP 및 KCTC11941BP).

[93]

[94] <실시예 3> 미생물의 셀룰로스 (cellulose) 분해 활성 확인

[95] 상기 <실시예 2>에 선별한 미생물의 셀룰로스 분해활성을 확인하기 위하여, 0.2% CMC의 MA 배지 내에서 30°C에서 이틀간 배양된 PDB-1 및 PDB-2의 세포외 단백질에 대해 4°C에서 염석(salting out)을 수행하였다. 대부분의 활성 셀룰라아제 분획물은 포화 황산 암모늄 50 내지 70% 범위 사이에서 침전되었고, 자이모그래피(zymography technique) 용법을 이용하여 탈염 분획물을 분석하였다.

[96] 구체적으로, 0.1 % CMC의 SDS-PAGE 젤을 제조한 후, 70 V 전기영동 한 다음, 리폴딩(refolding) 버퍼(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 및 1% Triton-X100)에서 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하고, 새로운 리폴딩 버퍼로 바꿨다. 1 시간 동안 추가로 인큐베이션을 한 뒤, 상기 젤을 150 mM NaCl으로 20 mM Tris-HCl, pH 8.0에서 하룻밤 동안 유지시킨 다음, 0.1% 콩고 레드(Congo Red)로 염색했다.

[97] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 CMC로 SDS-PAGE에 대한 자이모그램 분석을 수행한 결과, 각 세균의 다양한 분자량 및 유사한 소거 밴드(clear band)를 지니는 셀룰로스 분해 효소를 가지는 것을 확인하였고, 또한, 이들은 유사한 셀룰로스 분해 시스템을 가지고 있는 것을 확인하였다(도 2).

[98]

[99] <실시예 4> 미생물 유래 단백질의 활성 분석

[100] <4-1>N-말단 시퀀싱(sequencing)

[101] PDB-1의 35 kDa 단백질의 N-말단 시퀀싱을 수행했다. 70% 포화 황산암모늄(ammonium sulfate) 내의 PDB-1의 세포외 단백질의 침전 분획물을 SDS-PAGE 분석한 후, 이를 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(polyvinylidene difluoride membrane; PVDF) 상으로 전자이동(electrotransferred)시킨 후, 35 kDa 단백질의 N-말단 아미노산 시퀀싱을 Automatic Protein Sequencer(Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다.

[102] 그 결과, 상기 단백질의 N-말단 시퀀스는 NTAQTVV임을 확인하였다. 최근 들어, *C. algicola* DSM 14237의 게놈 시퀀스가 보고되었고, 네 개의 ORF에 대해

셀룰라아제(GenBank 등록번호. ADV51156, ADV50035, 및 ADV 47383) 및 글루코시드 가수분해 계열 5(GenBank 등록번호. ADV50845)로 주석이 달린 바가 있다. 그러나 35 kDa 단백질의 N-말단 시퀀스는 기타 공지된 셀룰로스 분해 효소는 물론, *C. algicola* DSM 14237 셀룰라아제와 매칭되지 않았다. 따라서, *Cellulophaga* 속 PDB-1은 신규한 셀룰로스 분해 시스템을 보유하고 있는 것을 확인하였다.

[103]

[104] <4-2> PDB-1의 분비 단백질의 분해 활성 분석

[105] PDB-1의 분비 단백질의 셀룰로스 분해 활성을 알아보기 위해, 450 μ L의 카르복시메틸셀룰로스(CMC), 20 μ m의 마이크로크리스탈린 셀룰로스 및 아비 셀 PH-101, 셀룰로스 섬유를 이용하여 0.5% 농도로 pH 5.0의 25 mM citrate 완충용액과 pH 7.0의 10 mM phosphate 완충용액에 현탁하였다. 각 반응용액에 50 μ g의 PDB-1의 분비 단백질을 첨가한 후, 30°C에서 1시간 동안 반응을 진행하였다. 100°C로 가열하여 효소를 실활 한 후, 방출된 환원당을 파라-하이드록시벤조산 히드라자이드 (*p*-hydroxybenzoic acid hydrazide; pHBH) 분석법을 이용하여 415 nm에서 흡광도변화를 통해 측정하였다 (Moretti and Thorson, 2008).

[106] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이, PDB-1의 분비 단백질은 CMC를 잘 가수분해하는 반면, 결정체 기질(substrate)는 효과적으로 가수분해할 수 없었다. 이를 통해 이들 효소가 셀룰로스의 비결정질 부위의 β -1,4 결합에 더욱 활성을 보임을 확인하였다. 또한, pH 5.0 및 pH 7.0에서의 특정 활성도는 유사함을 확인하였다. 따라서, PDB-1의 셀룰로스 분해 시스템은 산성 및 중성 pH에서 활동적이다. 해양환경은 일반적으로 약 알칼리성 조건이기 때문에 해양 환경에서 얻어진 대부분의 특징화된 셀룰라아제가 중성 및 약 알칼리 조건에서 최대 활성을 보이고, 산성 조건에서는 활성이 감소된다는 사실을 고려할 때, PDB-1의 셀룰로스 시스템이 pH 5.0 하에서 CMC를 잘 가수분해할 수 있다는 것은 흥미로운 사실이다. 또한, 총 세포외 단백질과 50 ~ 70%의 포화 황산암모늄에서의 침전 단백질이 유사한 특정 활성을 보였다. 따라서, PDB-1의 셀룰로스 분해 시스템은 산성 조건하에서도 활성을 유지했다. 이러한 특성은 산성 조건 하에서 전 처리된 셀룰로스 재료의 분해와 같은 생명공학적인 적용에서 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

[107]

[108] 표 1

[Table 1]

Substrate	Total Extracellular Protein (μg of reducing sugar end /min)		Precipitated protein at 50 ~ 70 % of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (μg of reducing sugar end /min)	
	pH 5.0	pH 7.0	pH 5.0	pH 7.0
CMC	64.1 $\pm$ 2.5	63.2 $\pm$ 2.5	69.3 $\pm$ 2.5	58.0 $\pm$ 2.8
20 μm microcrystalline cellulose	2.9 $\pm$ 0.8	3.5 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 1.0	3.5 $\pm$ 0.9
Avicel PH-101	2.5 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.8	2.7 $\pm$ 0.7	1.6 $\pm$ 0.8
Cellulose Fiber (medium)	3.5 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.8	2.4 $\pm$ 0.8

[109] <실시예 5> 셀룰로파가 PDB-1의 다당류 분해 활성 확인

[110] 셀룰로파가 PDB-1의 다당류 분해 능력을 측정하기 위하여 아래의 배지를 이용하여 셀룰로파가 PDB-1을 배양하였다. 각 배지는 0.2%의 탄소원에 인공 해수(Artificial sea water: NaCl 23.6 g/L, KCl 0.64 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.53 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.94 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.3g/L)에 효모 추출물(Yeast Extract) 1.0 g/L, 염화 암모늄(NH_4Cl) 0.5 g/L, 트리즈마 염(Trizma Base) 6.05 g/L을 첨가 한 후, 염산을 이용하여 pH 7.4로 적정하였다. 사용된 다당류는 포도당(glucose), 갈락토스(galactose), N-아세틸글루코사(N-acetylglucosamine, NAG), 자일로스(xylose)를 이용하였으며, 다당류로는 저온 용해성 아가로스(Agarose, Lonza), 알긴산(Alginate, Wako), 카라기난(Carrageenan, Sigma), 카르복시메틸셀룰로스(Carboxymethylcellulose, Sigma), 콜로이드 키틴(Colloidal chitin, Sigma), 라미나린(Laminarin, Sigma), 펙틴(Pectin from apple peel, Sigma), 풀루란(Pullulan, Sigma), 전분(Soluble starch, Difco), 자일란(Birchwood xylan, Sigma)을 이용하였으며 다당류 및 다당류가 첨가되지 않은 배지를 포함하여 배양하였다. 콜로이드 키틴은 농축 염산을 이용하여 종래의 방법으로 제조하였다. 종균 배양의 탄소원으로는 0.1 %의 Bacto-Trypton(Difco)를 이용하였다.

[111] 구체적으로, 균주를 3 mL 종균 배양(seed culture)한 후, 30 mL 종균 배양한 다음, 다당류 및 다당류를 포함하는 50 mL 배지를 main culture에서 30°C에서 배양하였다. 그런 다음, 원심분리를 통해 세포를 제거한 후, 배지 용액을 동결하여 보관하였다. 세포 밖으로 분비된 단백질의 양을 Lowey 방법으로

측정하였다. 분비 단백질의 활성 측정을 위해 반응에 이용된 다당류는 배지에 탄소원으로 이용된 다당류와 동일하였으며 저장액의 농도는 0.5%였다. 다당류 저장액과 배지를 혼합한 후, 30°C에서 24시간 동안 400 rpm으로 반응시켰다. 각 반응액을 1/10으로 희석한 후, 0.5M 염산 녹인 2 % (w/v) pHBH 와 2M NaOH의 1:1 혼합액 120 µL에 희석액 40 µL 섞은 후, 100°C에서 7분간 가열하였다. 그런 다음 마이크로플레이트(microplate) 분석을 이용하여 415 nm 흡광도를 측정하였다(Moretti and Thorson, 2008).

- [112] 그 결과, 도 3 내지 도 5에 나타낸 바와 같이, 셀룰로파가 PDB-1은 갈락탄, 글루칸, 자일란 및 다른 다당류에 대한 유의적인 다당류 분해 활성을 가지는 것을 확인하였다(도 3 내지 도 5).

[113]

[114] <실시예 6> 셀룰로파가 PDB-2의 다당류 분해 활성 확인

- [115] 셀룰로파가 PDB-2의 다당류 분해 능력을 측정하기 위하여 아래의 배지를 이용하여 셀룰로파가 PDB-2를 배양하였다. 각 배지는 0.2% 의 탄소원에 인공 해수(Artificial sea water: NaCl 23.6 g/L, KCl 0.64 g/L, MgCl₂·6H₂O 4.53 g/L, MgSO₄ H₂O 5.94 g/L, CaCl₂·H₂O 1.3g/L)에 효모 추출물(Yeast Extract) 1.0 g/L, 염화 암모늄(NH₄Cl) 0.5 g/L, 트리즈마 염(Trizma Base) 6.05 g/L을 첨가 한 후, 염산을 이용하여 pH 7.4로 적정하였다. 사용된 단당류는 포도당(glucose), 갈락토스(galactose), N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine, NAG), 자일로스(xylose)를 이용하였으며, 다당류로는 저온 용해성 아가로스(Agarose, Lonza), 알긴산(Alginate, Wako), 카라기난(Carrageenan, Sigma), 카르복시메틸셀룰로스(Carboxymethylcellulose, Sigma), 콜로이드 키틴(Colloidal chitin, Sigma), 라미나린(Laminarin, Sigma), 펙틴(Pectin from apple peel, Sigma), 풀루란(Pullulan, Sigma), 전분(Soluble starch, Difco), 자일란(Birchwood xylan, Sigma)을 이용하였으며 단당류 및 다당류가 첨가되지 않은 배지를 포함하여 배양하였다. 콜로이드 키틴은 농축 염산을 이용하여 종래의 방법으로 제조하였다. 종균 배양의 탄소원으로서 0.1 %의 Bacto-Trypton(Difco)를 이용하였다.

- [116] 구체적으로, 균주를 3 mL 종균 배양(seed culture)한 후, 30 mL 종균 배양한 다음, 단당류 및 다당류를 포함하는 50 mL 배지를 main culture에서 30°C에서 배양하였다. 그런 다음, 원심분리를 통해 세포를 제거한 후, 배지 용액을 동결하여 보관하였다. 세포 밖으로 분비된 단백질의 양을 Lowey 방법으로 측정하였다. 분비 단백질의 활성 측정을 위해 반응에 이용된 다당류는 배지에 탄소원으로 이용된 다당류와 동일하였으며 저장액의 농도는 0.5% 였다. 다당류 저장액과 배지를 혼합한 후, 30°C에서 24시간 동안 400 rpm으로 반응시켰다. 각 반응액을 1/10으로 희석한 후, 0.5M 염산 녹인 2 % (w/v) pHBH 와 2M NaOH의 1:1 혼합액 120 µL에 희석액 40 µL 섞은 후, 100°C에서 7분간 가열하였다. 그런 다음 마이크로플레이트 분석을 이용하여 415 nm 흡광도를 측정하였다(Moretti

and Thorson, 2008).

- [117] 그 결과, 도 6 내지 도 8에 나타낸 바와 같이, 셀룰로파가 PDB-2는 갈락탄, 글루칸, 자일란 및 다른 다당류에 대한 유의적인 다당류 분해 활성을 가지는 것을 확인하였다(도 6 내지 도 8).

[118]

[119] [수탁번호]

[120] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원관리본부 미 생물자원센터(KCTC)

[121] 수탁번호 : KCTC11940BP

[122] 수탁일자 : 20110524

[123] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원관리본부 미 생물자원센터(KCTC)

[124] 수탁번호 : KCTC11941BP

[125] 수탁일자 : 20110524

[126]

[127]

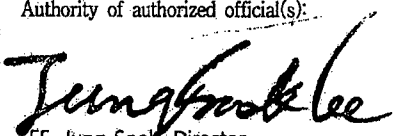
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : **YOON, Jung-Hoon**Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Cellulophaga</i> sp. PDB-1	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 11940BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: [☒] a scientific description [] a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May 24, 2011 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  LEE, Jung-Sook, Director Date: May 30, 2011

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

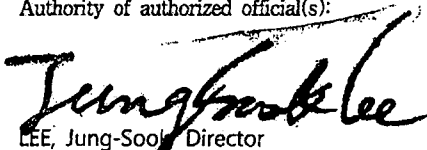
INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : **YOON, Jung-Hoon**

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
125 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Cellulophaga</i> sp. PDB-2	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 11941BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May 24, 2011 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  LEE, Jung-Sook, Director Date: May 30, 2011

청구범위

- [청구항 1] 수탁번호 KCTC11940BP로 기탁된 다당류 분해 활성을 갖는 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속 균주.
- [청구항 2] 수탁번호 KCTC11941BP로 기탁된 다당류 분해 활성을 갖는 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속 균주.
- [청구항 3] 제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 다당류는 아가로즈, 카라기난, 전분, 풀루란, 카르복시메틸셀룰로오즈(carboxymethylcellulose; CMC), 자일란, 라미나린, 키틴 및 펙틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 셀룰로파가(*Cellulophaga*) 속 균주.
- [청구항 4] 제 1항 또는 제 2항의 균주, 또는 이의 배양 상층액을 포함하는 다당류 분해용 조성물.
- [청구항 5] 제 1항 또는 제 2항의 균주, 또는 이의 배양 상층액을 포함하는 바이오 에탄올 생산용 조성물.
- [청구항 6] 제 1항 또는 제 2항의 균주, 또는 이의 배양 상층액을 다당류에 접촉시키는 단계를 포함하는 다당류 분해 방법.
- [청구항 7] 1) 바이오메스로부터 다당류를 분리하는 단계;
2) 단계 1)의 다당류에 제 1항 또는 제 2항의 균주, 또는 이의 배양 상층액을 접촉시켜 단당류를 생성시키는 단계; 및
3) 단계 2)의 단당류를 미생물에 의해 발효시키는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 제조방법.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 바이오메스는 다당류를 포함하는 벚짚, 보릿짚, 고구마 줄기, 유채줄기, 카사바 줄기의 농업 부산물, 폐지, 플러프의 고체 쓰레기, 간벌목, 폐목재, 가공 부산물의 목재, 담조류, 해조류의 수생 식물 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 바이오에탄올의 제조방법.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 단계 1)의 다당류는 아가로즈, 카라기난, 전분, 풀루란, 카르복시메틸셀룰로오즈, 자일란, 라미나린, 키틴 및 펙틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 바이오에탄올 제조방법.
- [청구항 10] 제 7항에 있어서, 상기 단계 3)의 미생물은 사카로마이세스 세레비시애, 사르시나 벤트리쿨리, 클루이베로마이세스 프라질리스, 자이고모모나스 모빌리스, 클루이베로마이세스 막시아너스 IMB3, 브레타노마이세스 쿠스테르시이, 클로스트리디움 아세토부틸리쿰, 클로스트리디움 바이에링키, 클로스트리디움 아우란티부틸리쿰 및 클로스트리디움

테타노모르폼으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 바이오에탄올 제조방법.

[청구항 11]

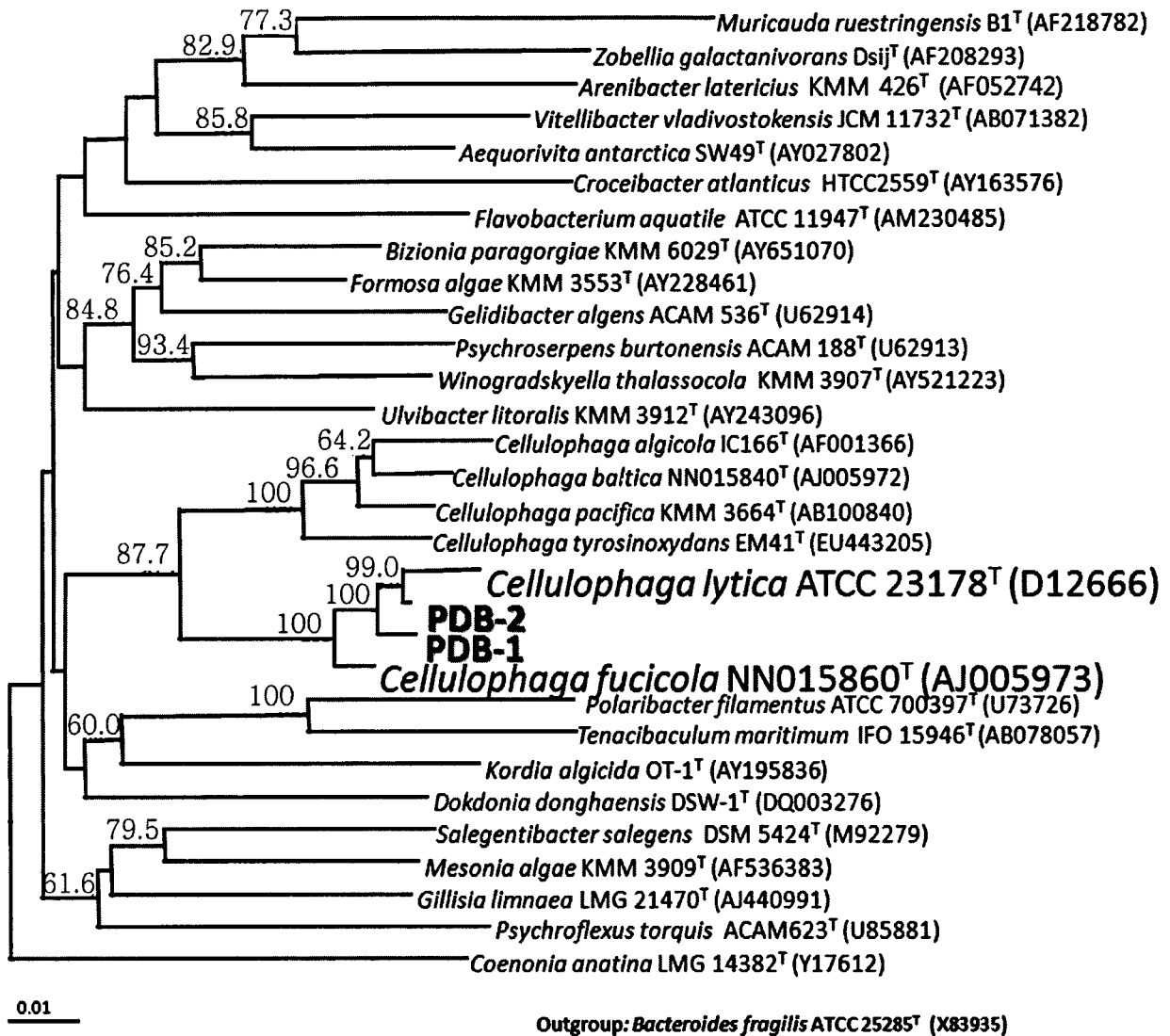
다당류 분해용 조성물로 사용하기 위한, 제 1항 또는 제 2항의 균주, 또는 이의 배양 상층액.

[청구항 12]

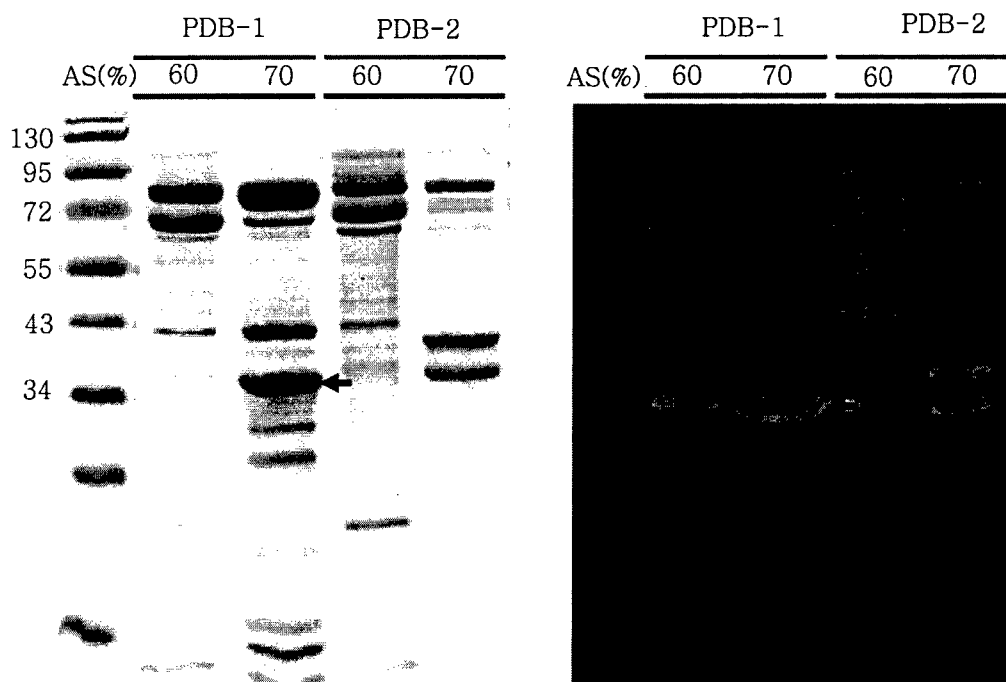
바이오 에탄올 생산용 조성물로 사용하기 위한, 제 1항 또는 제 2항의 균주, 또는 이의 배양 상층액.

[Fig. 1]

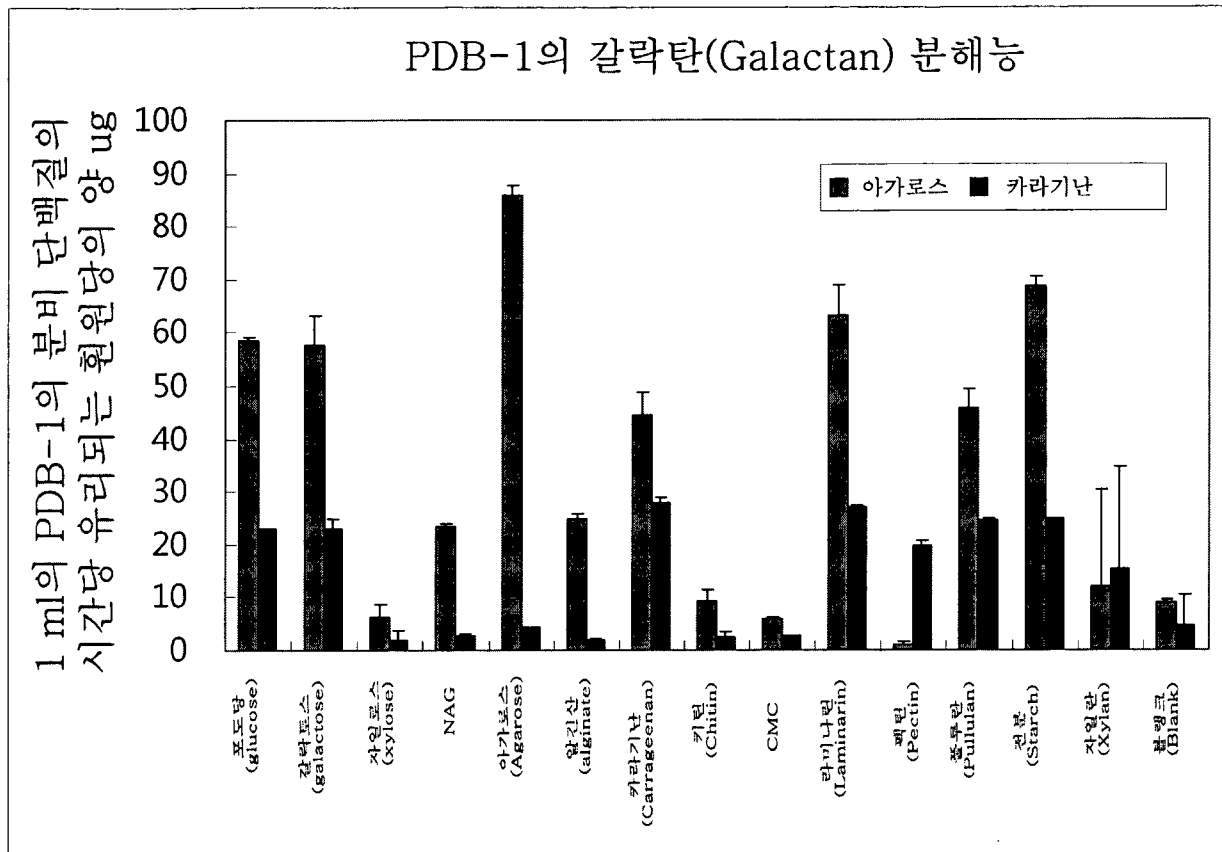
1/4



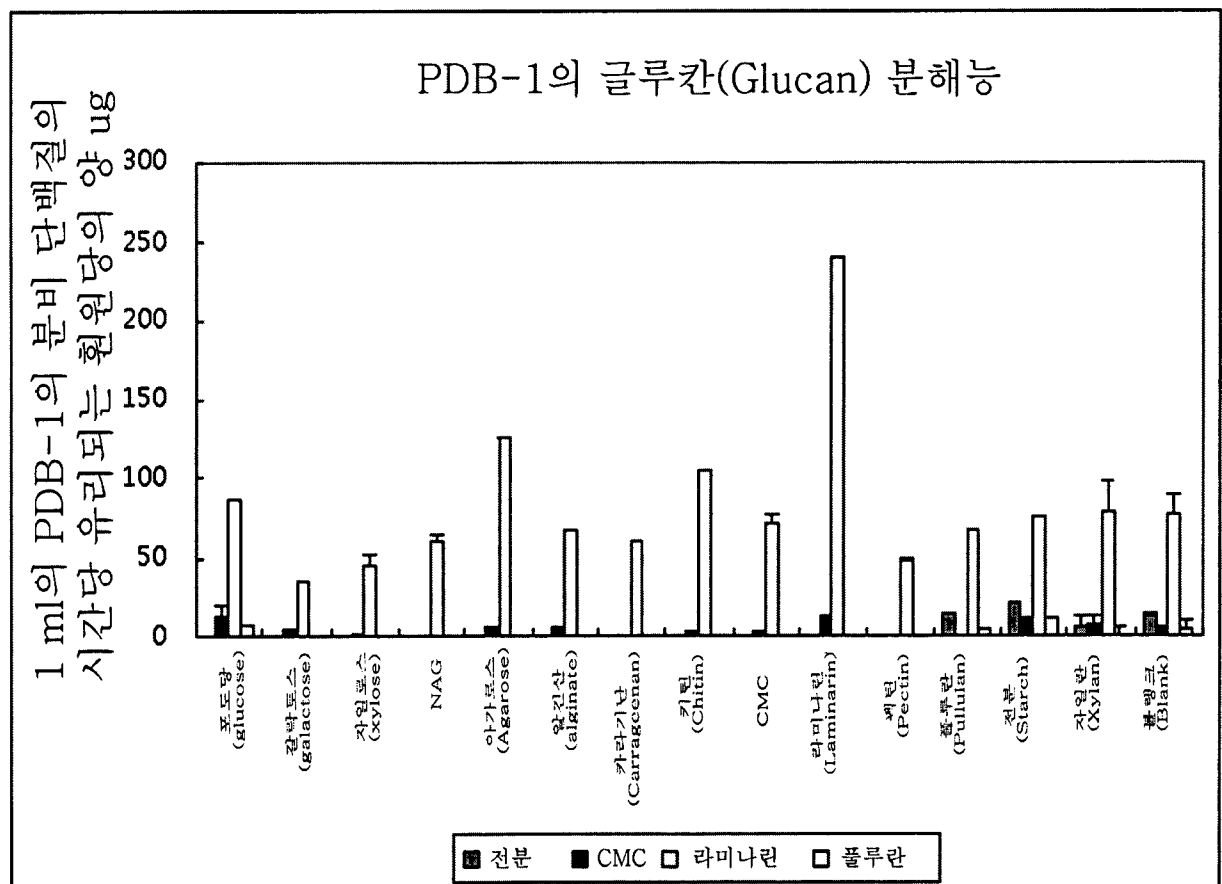
[Fig. 2]



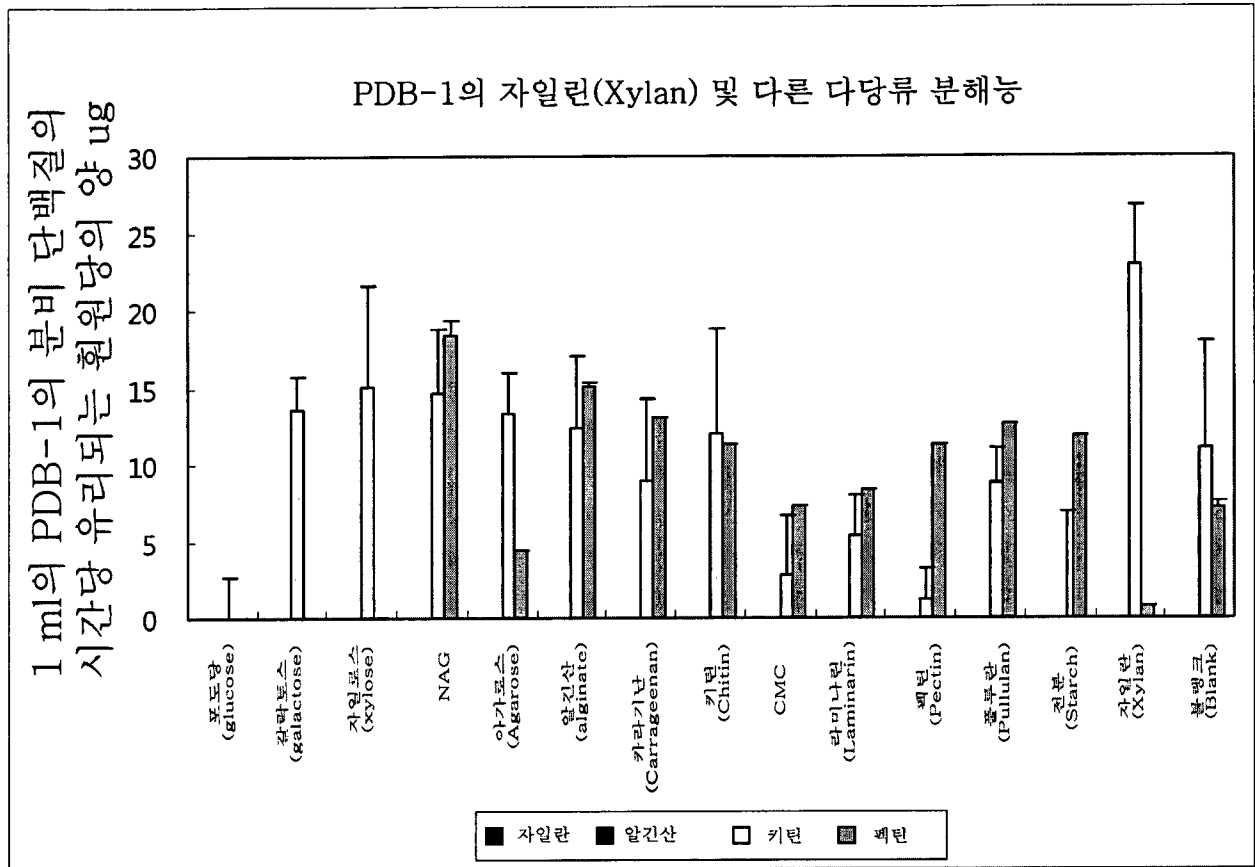
[Fig. 3]



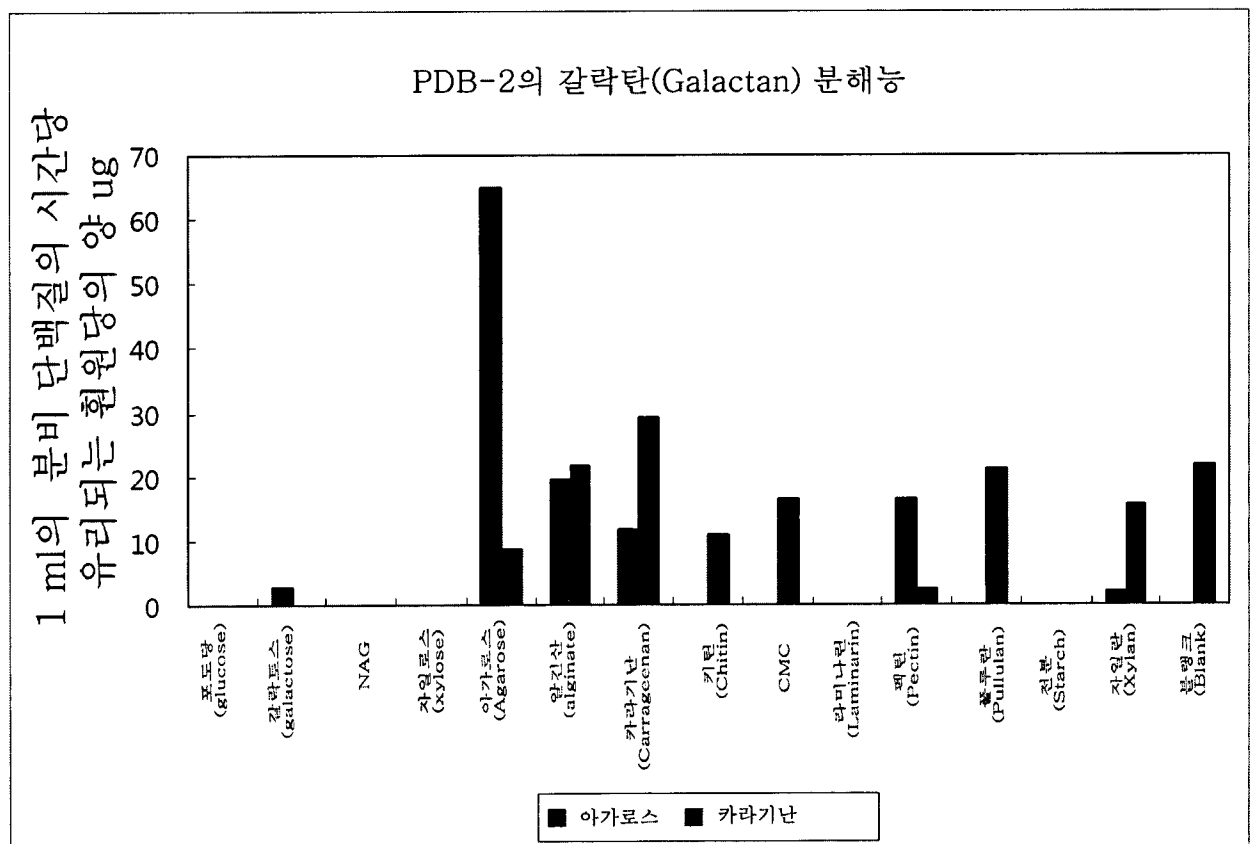
[Fig. 4]



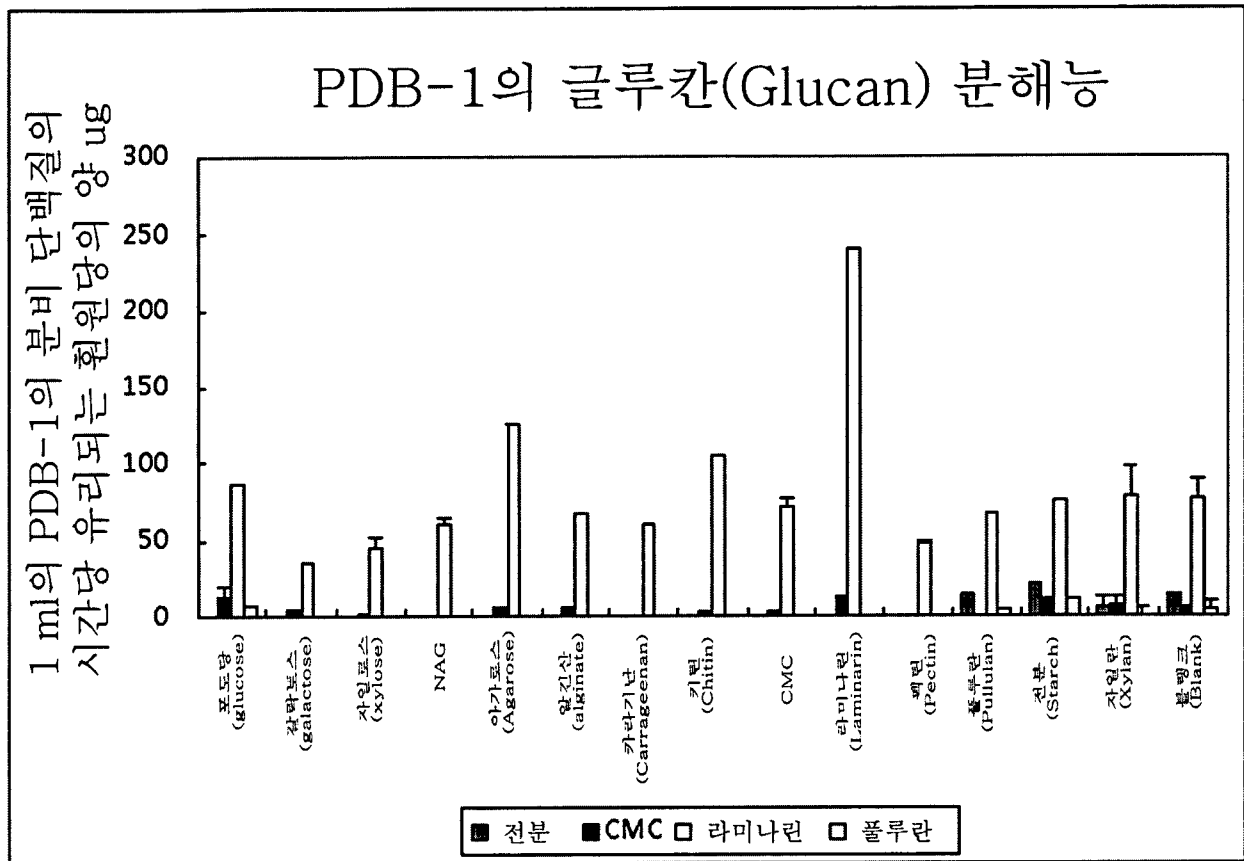
[Fig. 5]



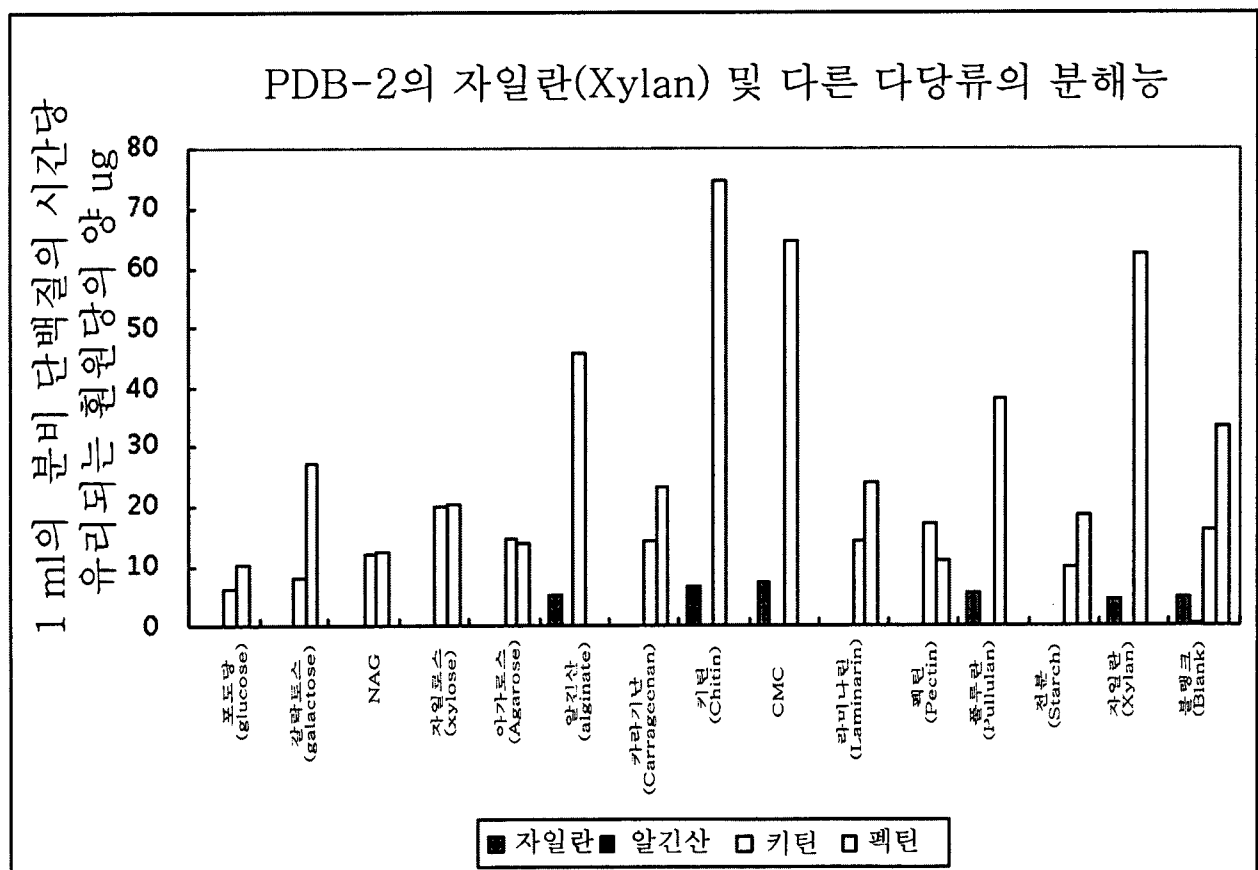
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/003810**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 1/20(2006.01)i, C12P 19/00(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 1/20; C12P 19/14; C12N 9/24

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
Japanese Utility models and applications for Utility models

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cellulophaga sp., polysaccharide, decomposition, bio ethanol.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OH, GI HUN et al., "Polysaccharide degradation activity of novel marine bacteria Cellulophaga sp. M-M6 and M-M24.", Journal of International Conference of the Microbiological Society of Korea, 12 May 2011, page 167(C002).	1-4,6,11,12
Y	See abstract.	5,7-10
Y	SHUHEI YANASE et al., "Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast.", Biotechnology Journal (May 2010), Vol. 5, No. 5, pages 449-455, ISSN: 1860-6768(p), 1860-7314(e).	5,7-10
A	See abstract.	1-4,6,11,12
A	LEE, EUN JEONG et al., "Industrial scaled optimization for production of carboxy-methylcellulase and cellobiase by marine bacterium Cellulophaga lytica LBH-14 from Rice Bran.", Journal of International Conference of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 24 June 2010, page 395(N-6). See abstract.	1-12
A	JP 2007-236236 A (SAGA PREFECTURE, SAGAKEN CHIKI SANGYO SHIEN CENTER et al.) 20 September 2007 See the entire document.	1-12



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

25 APRIL 2012 (25.04.2012)

Date of mailing of the international search report

27 APRIL 2012 (27.04.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/003810

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KANG, HYEONG IL et al., "Cellulophaga tyrosinoydans sp. nov., a tyrosinase-producing bacterium isolated from seawater.", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (April 2009), Vol. 59, No. 4, pages 654-657, ISSN: 1466-5026(p), 1466-5034(e). See the entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/003810

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2007-236236 A	20.09.2007	JP 4883277 B2	22.02.2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12N 1/20(2006.01)i, C12P 19/00(2006.01)i, C12P 7/06(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20; C12P 19/14; C12N 9/24 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 셀룰로파가, 다당류, 분해, 바이오에탄올.		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	오기훈 외 4인, 'Polysaccharide degradation activity of novel marine bacteria Cellulophaga sp. M-M6 and M-M24.', 한국미생물학회 국제학술대회 발표집, 2011.05.12., 페이지 167(C002).	1-4,6,11,12
Y	초록 참조.	5,7-10
Y	SHUHEI YANASE 외 8인, 'Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast.', Biotechnology Journal (2010.05.), 제5권, 제5호, 페이지 449-455, ISSN: 1860-6768(p), 1860-7314(e).	5,7-10
A	요약 참조.	1-4,6,11,12
A	이은정 외 5인, 'Industrial scaled optimization for production of carboxy-methylcellulase and cellobiase by marine bacterium Cellulophaga lytica LBH-14 from Rice Bran.', 한국 미생물·생명공학회 국제학술대회 발표집, 2010.06.24., 페이지 395(N-6).	1-12
A	JP 2007-236236 A (재단법인 사가현 지역 산업지원센터 외 1명) 2007.09.20 문서 전체 참조.	1-12
☒ 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 “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 신구성 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 2012년 04월 25일 (25.04.2012)	국제조사보고서 발송일 2012년 04월 27일 (27.04.2012)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 82-42-481-8150 	

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	강형일 외 5인, 'Cellulophaga tyrosinoydans sp. nov., a tyrosinase-producing bacterium isolated from seawater.', International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2009.04), 제59권, 제4호, 페이지 654-657, ISSN: 1466-5026(p), 1466-5034(e). 문서 전체 참조.	1-12

국제출원번호
PCT/KR2011/003810

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2007-236236 A	2007.09.20	JP 4883277 B2	2012.02.22