(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 11 월 4 일 (04.11.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/221418 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/195 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01) *C12P 19/02* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/005276

(22) 국제출원일: 2021 년 4 월 27 일 (27.04.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0050750 2020 년 4 월 27 일 (27.04.2020) KR

(71) 출원인: 대상 주식회사 (**DAESANG CORPORATION**) [KR/KR]; 02586 서울시 동대문구 천호대로 26 (신설동), Seoul (KR).

(72) 발명자: 윤형섭 (**YOUN, Hyung Seop**); 17384 경기도 이천시 마장면 중부대로 697, Gyeonggi-do (KR). 최은석 (**CHOI, Eun Seok**); 17384 경기도 이천시 마장면 중부대로 697, Gyeonggi-do (KR). 이지하 (**LEE, Ji Ha**); 17384 경기도 이천시 마장면 중부대로 697, Gyeonggi-do (KR). 김석수 (**KIM, Suok Su**); 17384 경기도 이천시 마장면 중부대로 697, Gyeonggi-do (KR). 조승우 (**CHO, Seung Woo**); 17384 경기도 이천시 마장면 중부대로 697, Gyeonggi-do (KR). 김태용 (**KIM, Tae Yong**); 02154 서울시 중랑구 면목로 470(상봉동), Seoul (KR). 김학준 (**KIM, Hak Jun**); 17384 경기도 이천시 마장면 중부대로 697, Gyeonggi-do (KR).

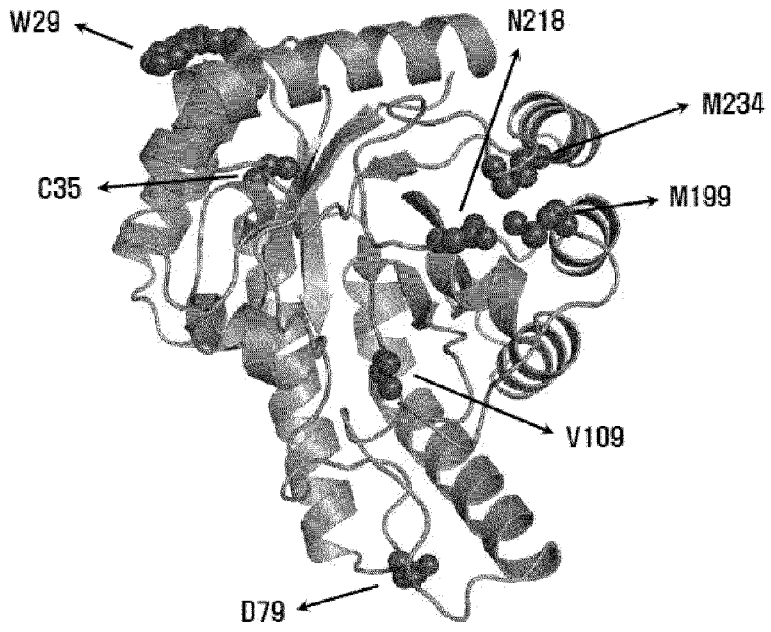
(74) 대리인: 임상엽 (**LIM, Sang Yeob**); 04788 서울시 성동구 광나루로 130, 7층 704호 (성수동1가, 서울숲IT캐슬), Seoul (KR).

(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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

WO 2021/221418 A1

(54) **Title:** ALLULOSE EPIMERASE VARIANT, METHOD FOR PRODUCING SAME, AND METHOD FOR PRODUCING ALLULOSE USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 알룰로스 에피머화 효소 변이체, 이의 제조방법 및 이를 이용한 알룰로스의 제조방법



(57) **Abstract:** The present invention provides: a novel allulose epimerase variant in which an amino acid residue present at a specific position of an amino acid sequence of a wild-type D-allulose 3-epimerase derived from *Flavonifractor plautii* is substituted with another amino acid residue; and various uses of the novel allulose epimerase variant. The novel allulose epimerase variant according to the present invention has a higher conversion rate of fructose to allulose compared to that of the wild-type D-allulose 3-epimerase derived from *Flavonifractor plautii*, and has excellent thermal stability especially under high temperature conditions of 60 °C or higher, and thus can prevent contamination during an industrial-scale enzymatic conversion reaction for the mass production of allulose, shorten production time, and reduce production costs.

[다음 쪽 계속]

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, 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))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 아미노산 서열 중 특정 위치에 존재하는 아미노산 잔기가 다른 아미노산 잔기로 치환된 신규 알룰로스 에피머화 효소 변이체 및 이의 다양한 용도를 제공한다. 본 발명에 따른 신규 알룰로스 에피머화 효소 변이체는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소에 비해 과당의 알룰로스로의 전환 활성이 높고, 특히 60℃ 이상의 고온 조건에서 열 안정성이 매우 우수하기 때문에 알룰로스의 대량 생산을 위한 산업화 수준의 효소 전환 반응시 오염을 방지할 수 있고 생산 시간을 단축시킬 수 있으며 생산 비용을 절감시킬 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 알룰로스 에피머화 효소 변이체, 이의 제조방법 및 이를 이용한 알룰로스의 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 알룰로스 에피머화 효소 변이체 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유래의 D-알룰로스 3-에피머화 효소에 비해 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성이 향상된 알룰로스 에피머화 효소 변이체 및 이로부터 파생된 다양한 발명들에 관한 것이다.

배경기술

[2] D-알룰로스(D-allulose)는 과당(fructose)의 3번 탄소의 에피머(epimer)로서 D-사이코스(D-psicose)로도 불리운다. D-알룰로스(D-allulose)는 설탕과 비교했을 때 70% 감미도를 갖지만(Oshima 2006) 에너지는 0.3% 밖에 없으므로 다이어트 식품의 저칼로리 감미료로 적용 가능한 기능성 단당류이다(Matsuo et al. 2002). 또한, D-알룰로스(D-allulose)는 포도당 흡수 및 혈당을 억제하는 기능이 있어 당뇨병 환자용 음식품, 수신용 음식품 등에 응용할 수 있으며, 간에서의 지질합성에 관여하는 효소 활성의 억제를 통해 복부 지방 축적을 억제 할 수 있으므로 건강식품 등 여러 기능성 식품 등에 사용할 수 있다(Matsuo et al. 2001; Iida et al. 2008; Hayashi et al. 2010; Hossain et al. 2011).

[3] 위와 같은 특징으로 알룰로스는 설탕을 대체 할 수 있는 좋은 소스이나 자연계에 극히 드물게 존재하는 단당류인 희소당에 속하기 때문에 식품산업에 적용하기 위해서는 알룰로스를 효율적으로 생산하는 방법이 필요하다. 기존의 알룰로스 생산 방법으로는 주로 화학적 과정을 거쳐 생산되었다. 빌릭(Bilik) 등은 몰리브덴산 이온의 촉매작용을 이용하여 과당을 알룰로스로 전환하는 방법을 제안하였다. 맥도날드(McDonald)는 1,2:4,5-디-δ-이소프로필리덴-베타-D-프락토피라노스(1,2:4,5-di-δ-isopropylidene-beta-D-fructopyranose)로부터 3단계의 화학적 처리과정으로 알룰로스를 생산하였다. 또한, 도너 (Doner)는 에탄올과 트리메틸아민과 함께 과당을 가열하여 알룰로스를 생산하였다. 그러나 이들 화학적 생산방법은 비용이 많이 소모되는 반면 그 효율은 낮고 또한 부산물들이 상당량으로 발생한다는 단점이 있다.

[4] 생물학적 알룰로스 생산방법으로는 미생물의 세포반응을 이용하여 갈락티톨(galactitol), D-타가토스 또는 D-탈리톨 등으로부터 알룰로스를 생산하는 방법이 제안되었다(Ken Izumori). 그러나 이 방법은 기질이 희소당에 속하기 때문에 산업적 생산에 응용하기 힘들다. 산업화에 가장 효율적인 방법은 D-케토오스 3-에피머화 효소군 중 과당을 알룰로스로 전환하는 효소를 찾는 방법이다. 기존에 발표된 내용은 크로스트리디움 셀루로리티쿰 H(10)(Mu et al. 2011),

아그로박테리움 투메패시언스(Kim et al. 2006), 슈도모나스 치코리(Itoh at al. 1994), 리조비움 스페로이데스 (Zhang et al. 2009) 유래의 D-타가토스 3-에피머화 효소를 대장균에 삽입하여 형질전환 시킨 후 형질전환 된 대장균에서 발현된 D-타가토스 3-에피머화 효소를 사용하여 과당으로부터 알룰로스를 생산하였다.

[5] 효소를 사용하여 과당으로부터 알룰로스를 생산하는 기술과 관련하여, 대한민국 등록특허공보 제10-0744479호에는 아그로박테리움 투메패시엔스 유래의 알룰로스 에피머화 효소에 의한 알룰로스의 생산 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-0832339호에는 과당을 알룰로스로 전환하는 활성을 지닌 시노리조비움 속 (Sinorhizobium) YB-58 KCTC 10983BP와 이를 이용하여 과당을 알룰로스로 전환하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1106253호에는 과당의 알룰로스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 아그로박테리움 투메패시엔스 C58의 알룰로스 3-에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대장균 및 이를 이용하여 과당으로부터 알룰로스를 생산하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1339443호에는 리조븀속(genus Rhizobium)에 속하는 미생물로부터 유래하는 케토오스 3-에피머라아제(ketose 3-epimerase) 및 이를 이용하여 과당을 알룰로스로 전환하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1318422호에는 크로스트리디움 신덴스(Clostridiuim scindens)로부터 유래된 D-알룰로스 3-에피머화 효소 및 이를 이용하여 과당으로부터 알룰로스를 생산하는 방법이 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1473918호에는 플라보니프랙터 플라우티(Flavonifractor plautii)에서 유래하는 D-알룰로스 3-에피머화 효소 및 이를 이용하여 과당으로부터 알룰로스를 생산하는 방법이 개시되어 있다.

[6] 그러나, 미생물로부터 유래한 야생형(Wild type)의 D-알룰로스 3-에피머화 효소는 과당의 알룰로스로의 전환율이 높지 않고, 열 안정성이 낮아 최적 활성 온도에서 실활되는 속도가 빨라 산업화에 적당하지 않다. 따라서, 미생물로부터 유래한 야생형(Wild type)의 D-알룰로스 3-에피머화 효소에 비해 과당의 알룰로스로의 전환율 또는 열 안정성이 향상된 신규한 D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체 개발이 필요하다. D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체와 관련하여 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0021974호에는 유전자 수준에서 돌연변이를 유도하여 높은 온도에서의 빠른 알룰로스 전환속도와 안정성을 보이는 트레포네마 프리미티아 ZAS-1 유래의 D-알룰로스 3-에피머화 효소가 개시되어 있고, 대한민국 등록특허공보 제10-1203856호에는 아그로박테리움 투머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 유래의 야생형 알룰로스 에피머화 효소의 변이를 통해 수득한 열 안정성이 향상된 알룰로스 에피머화 효소 변이체가 개시되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 종래의 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명은 첫 번째 목적은 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유래 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소에 비해 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성이 향상된 신규 D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체를 제공하는데에 있다.

[8] 본 발명의 두 번째 목적은 신규 D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체를 제조하는 방법 또는 신규 D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들을 제공하는데에 있다.

[9] 본 발명의 세 번째 목적은 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 방법 또는 과당으로부터 알룰로스를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들을 제공하는데에 있다.

기술적 해결방법

[10] 본 발명의 출원인은 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소 및 이를 이용하여 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 발명에 대해 특허출원하여 등록받은 바 있다[대한민국 등록특허 제10-1473918호(2014.12.11)]. 상기 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유래 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소는 약 6.5~7.0의 pH 범위 및 약 62~66℃의 온도 조건에서 과당의 알룰로스로의 전환에 대한 최대 활성을 보이나, 최적 온도 조건에서 반응 시간이 지남에 따라 효소 활성이 급격하게 떨어지기 때문에 알룰로스의 대량 생산을 위한 산업화 단계에서 그 활용도에 한계를 가진다. 또한, 일반적으로 알룰로스의 대량 생산을 위한 효소 전환 반응은 오염 방지를 위해 고온에서 실시되기 때문에 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소를 산업화에 적용하기 위해서는 열 안정성을 크게 향상시킬 필요가 있다. 본 발명의 발명자는 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소가 가지는 내재적 문제점을 인식하고 단백질 구조 예측 기술을 활용하여 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 아미노산 서열에서 화학 결합의 변화시 전환율 및 열 안정성 향상과 관련될 것으로 예상되는 아미노산 잔기 위치 후보들을 도출하고, 이 중 특정 위치의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 치환시키는 경우 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성이 향상된다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[11]

[12] 상기 첫 번째 목적을 해결하기 위하여 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 제공한다.

[13] 상기 두 번째 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열,

서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주를 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주를 배양하여 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 발현시키는 단계; 및 상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체가 발현된 재조합 균주의 파쇄물로부터 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 분리하는 단계를 포함하는 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 제조방법을 제공한다.

[14] 상기 세 번째 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 포함하는 알룰로스 생산용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물 또는 상기 재조합 균주의 파쇄물을 포함하는 알룰로스 생산용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 과당을 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체 또는 상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 알룰로스의 제조방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 과당을 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 상기 재조합 균주의 파쇄물 또는 이들 중 어느 하나 이상을 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 알룰로스의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[15] 본 발명에 따른 신규 알룰로스 에피머화 효소 변이체는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소에 비해 과당의 알룰로스로의 전환 활성이 높고, 특히 60℃ 이상의 고온 조건에서 열 안정성이 매우 우수하기 때문에 알룰로스의 대량 생산을 위한 산업화 수준의 효소 전환 반응시 오염을 방지할 수 있고 생산 시간을 단축시킬 수 있으며 생산 비용을 절감시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 본 발명의 발명자들이 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유래 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성 향상시키기 위해 치환 후보로 선정한 7개의 아미노산 잔기 위치를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[17] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[18]

[19] 본 발명의 일 측면은 과당을 알룰로스로 전환시킬 수 있는 신규 D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체(이하, '알룰로스 에피머화 효소 변이체'라 한다)에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체 W29K는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 아미노산 서열 중 29번째 위치에 존재하는 트립토판(Trp)이 라이신(Lys)으로 치환된 것이다. 또한, 본 발명의 바람직한 일 예에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체 W29K/M234I는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 아미노산 서열 중 29번째 위치에 존재하는 트립토판(Trp)이 라이신(Lys)으로 치환되고 동시에 234번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)이 이소류신(Ile)으로 치환된 것이다. 또한, 본 발명의 더 바람직한 일 예에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체 W29K/G216S/M234I는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 아미노산 서열 중 29번째 위치에 존재하는 트립토판(Trp)이 라이신(Lys)으로 치환되고 216번째 위치에 존재하는 글리신(Gly)이 세린(Ser)으로 치환되고 동시에 234번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)이 이소류신(Ile)으로 치환된 것이다. 본 발명에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체 W29K, W29K/M234I 및 W29K/G216S/M234I는 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소에 비해 과당의 알룰로스로의 전환 활성이 높고, 특히 60℃ 이상의 고온 조건에서 열 안정성이 매우 우수하다. 상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체는 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)에서 유래한 야생형 D-알룰로스 3-에피머화 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 14의 염기서열로 이루어짐)를 주형으로 하고

소정의 염기서열을 가진 올리고뉴클레오티드를 프라이머쌍으로 하여 PCR을 수행하고, 이후 증폭된 변이체 단편의 쌍을 주형으로 하고 제한 효소 인식 부위의 서열이 도입된 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 overlap extentention PCR을 수행하고, 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 발현 벡터를 제조한 후, 상기 재조합 발현 벡터로 숙주 균주를 형질전환시켜 재조합 균주를 제조한 후, 상기 재조합 균주를 배양하여 발현시키는 방법으로 얻어질 수 있다. 본 발명에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체는 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어지나, 본 발명에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 균등 범위가 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 본 발명에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 균등 범위는 과당을 알룰로스로 전환하는 활성 및 60℃ 이상의 고온에서 열 안정성이 유지되는 한, 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열 중 일부 아미노산이 치환, 삽입 및/또는 결실된 것일 수 있다. 상기 아미노산의 치환은 바람직하게는 단백질의 특성이 바뀌지 않는 보존적 아미노산 치환(conservative amino acid replacement)에 의해 이루어지는 것이 바람직하다. 또한, 상기 아미노산의 변형은 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등에 의해 이루어질 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 균등 범위는 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 과당의 알룰로스로의 전환에 대한 활성이 증가한 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 균등 범위는 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95%이상, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[20]

[21] 본 발명의 다른 측면은 신규 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 제조하는 방법 또는 신규 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들에 관한 것이다. 상기 신규 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들로는 폴리뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 재조합 벡터, 재조합 균주 등이 있다.

[22] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이고, 바람직하게는 서열번호 15의 염기 서열, 서열번호 24의 염기 서열 또는 서열번호 26의 염기 서열에서 선택된 어느 하나의 염기 서열로 이루어진다. 본 발명에서 사용하는 용어 "폴리뉴클레오티드"는

비변형(non-modified) 또는 변형된(modified) 모든 폴리리보뉴클레오티드(RNA) 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(DNA)를 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일- 또는 이중-가닥 DNA, 단일-및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥 RNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA 또는 이들의 하이브리드 분자를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 균등 범위는 서열번호 15의 염기 서열, 서열번호 24의 염기 서열 또는 서열번호 26의 염기 서열에서 선택된 어느 하나의 염기 서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 상기의 실질적인 동일성은 서열번호 15의 염기 서열, 서열번호 24의 염기 서열 또는 서열번호 26의 염기 서열에서 선택된 어느 하나의 염기 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 그 서열을 분석하여, 상기 임의의 다른 서열이 서열번호 15의 염기 서열, 서열번호 24의 염기 서열 또는 서열번호 26의 염기 서열에서 선택된 어느 하나의 염기 서열과 70% 이상, 90% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 것을 의미한다. 당해 분야의 통상의 지식을 가진 기술자는 당해 분야에 공지된 유전자 재조합 기술 등을 이용하여 상기 폴리뉴클레오티드의 염기 서열 중 하나 또는 그 이상의 염기를 치환, 부가 또는 결실시킴으로써 상기 실질적 상동성을 갖는 범위에서 동일한 활성을 갖는 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제조할 수 있음을 용이하게 이해할 수 있을 것이다. 이러한 상동성의 비교는 시판되는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산하여 수행될 수 있다.

[23] 또한, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 합성하기 위한 것으로서, 바람직하게는 아미노산 잔기 치환 위치 및 종류에 따라 다음과 같은 염기서열을 가진 순방향 프라이머와 역방향 프라이머로 구성된다.

[24] <u>W29K</u>

[25] * 순방향 프라이머 염기서열(5'→3')

[26] CCCTGATGGAGAAGCTGGCCAAACTGGGCTTTGACATCTGCGA

[27] * 역방향 프라이머 염기서열(5'→3')

[28] TCGCAGATGTCAAAGCCCAGTTTGGCCAGCTTCTCCATCAGGG

[29]

[30] <u>G216S</u>

[31] * 순방향 프라이머 염기서열(5'→3')

[32] GGCTGGGGCATTTCCACGTGAGCGAGAACAACCGCCGCCCCGC

[33] * 역방향 프라이머 염기서열(5'→3')

[34] GCGGGGCGGCGGTTGTTCTCGCTCACGTGGAAATGCCCCAGCC

[35]

[36] M234I

[37] * 순방향 프라이머 염기서열(5'→3')

[38] ACCGCCTGCCCTGGAAGGACATTGCCGCCGCCCTCAAGCAGGT

[39] * 역방향 프라이머 염기서열(5'→3')

[40] ACCTGCTTGAGGGCGGCGGCAATGTCCTTCCAGGGCAGGCGGT

[41]

[42] 또한, 상기 재조합 벡터는 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 상기 재조합 벡터는 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 공지의 표준 방법을 사용하여 클로닝 벡터나 발현 벡터 내로 삽입한 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에서 사용하는 용어 "클로닝 벡터"는 숙주 세포 내로 DNA 단편을 운반하고 이를 재생산할 수 있는 물질로 정의된다. 본 발명에서 클로닝 벡터는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal), 전사 종결 서열(transcription termination sequence) 및 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 다중 클로닝 위치(multiple cloning site)는 적어도 하나의 엔도뉴클레아제(endonuclease) 제한효소 절단위치(restriction site)를 포함한다. 또한, 클로닝 벡터는 프로모터를 더 포함할 수 있다. 일 예로, 본 발명에서 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 폴리아데닐레이션 시그널(polyadenylation signal) 및 전사 종결 서열(transcription termination sequence)의 상류(upstream)에 위치할 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용하는 용어 "발현 벡터"는 적절한 숙주 안에서 클로닝된 DNA의 전사와 번역을 위해 필요한 DNA 서열로 정의된다. 또한, 본 발명에서 사용하는 용어 "발현 벡터"는 개체의 세포 내에 존재하는 경우 삽입물이 발현되도록 삽입물에 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 표준적인 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조 및 정제될 수 있다. 상기 발현 벡터의 종류는 원핵세포 및 진핵세포의 각종 숙주 세포에서 원하는 유전자를 발현하고, 원하는 단백질을 생산하는 기능을 하는 한 특별히 한정되지 않지만, 강력한 활성을 나타내는 프로모터와 강한 발현력을 보유하면서 자연 상태와 유사한 형태의 외래 단백질을 대량으로 생산할 수 있는 벡터가 바람직하다. 발현 벡터는 적어도, 프로모터, 개시코돈, 원하는 단백질을 코드하는 유전자 및 종결코돈 터미네이터를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 그 외에 시그널 펩티드를 코딩하는 DNA, 추가적 발현 조절 서열, 원하는 유전자의 5'측 및 3'측의 비번역 영역, 선택마커 영역, 또는 복제가능단위 등을 적절하게 포함할 수도 있다. "프로모터"는 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열을 의미한다. 또한, 상기 프로모터에는 세포 유형 특이적 또는 외부의 신호 또는 제제에 의해 유도되는

조절 가능한 프로모터 의존적 유전자를 발현하도록 하는데에 충분한 프로모터 구성이 포함될 수 있으며, 이러한 구성들은 유전자의 5' 또는 3' 부분에 위치할 수 있다. 상기 프로모터에는 보존적 프로모터 및 유도적 프로모터 둘 다 포함된다. 프로모터 서열은 원핵생물, 진핵생물 또는 바이러스로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 사용하는 용어 "작동가능하게 연결된"은 단일 폴리뉴클레오티드 상의 폴리뉴클레오티드 서열 연관성으로 하나의 기능이 다른 것에 의해 조절된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 발현을 제어할 수 있는 경우(즉, 코딩 서열이 프로모터의 전사 조절하에 있는 경우) 프로모터는 코딩 서열과 연결되어 작동되거나, 리보좀 결합 자리가 번역을 촉진시킬 수 있도록 위치하고 있다면, 리보좀 결합 자리는 코딩 서열에 연결되어 작동되는 것이다. 코딩 서열은 센스 방향 또는 안티센스 방향에서 조절 서열에 연결되어 작동될 수 있다. 본 발명에 따른 재조합 벡터는 바람직하게는 발현 벡터이다.

[43] 또한, 상기 재조합 균주는 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 형질전환되거나 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 것이다. 본 발명에서 사용하는 용어, "재조합 균주"는 하나 이상의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이를 갖는 발현 벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 세포를 의미한다. 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하기 위한 방법으로는 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposemmediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기천공법(electroporation) , 전기주입법(electroinjection), PEG 등의 화학적 처리방법, 유전자 총(gene gun) 등을 이용하는 방법, 열충격(heat shock) 방법 등이 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 숙주 세포로는 원핵 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 세포 등 당업계에 공지된 것이라면 그 종류가 크게 제한되지 않으며, 바람직하게는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 예를 들어, 상기 숙주 세포는 대장균일 수 있다. 상기 대장균으로 BL21, JM109, K-12, LE392, RR1, DH5α 또는 W3110 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이 외에도, 상기 숙주 세포로서 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스속 균주, 코리네박테리움 글루타미쿰과 같은 코리네 박테리아속 균주, 살모넬라 티피무리움 등의 살모넬라속 균주, 기타 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등으로 이루어진 군에서 선택된 균주를 사용하여도 무방하다.

[44] 또한, 상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 제조방법은 서열번호 2의

아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 형질전환되거나 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주를 배양하여 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 발현시키는 단계; 및 상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체가 발현된 재조합 균주의 파쇄물로부터 사이코스 에피머화 효소를 분리하는 단계를 포함한다. 숙주 세포에 의한 단백질의 발현은 락토스(Lactose), 유도 인자인 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside) 등을 사용하여 발현을 유도할 수 있고, 유도시간은 단백질의 양을 최대화되게 조절할 수 있다. 본 발명에서 알룰로스 에피머화 효소 변이체는 재조합 균주의 파쇄물로부터 회수될 수 있다. 단백질 발현에 사용된 세포는 동결-해동 반복, 초음파 처리, 기계적 파괴 또는 세포 분해제와 같은 다양한 물질적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있으며, 통상적인 생화학적 분리 기술에 의해서 분리 또는 정제가 가능하다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laborarory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Deuscher, M., Guide to Protein Purification Methods Enzymology, Vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA, 1990). 예를 들어, 숙주 세포에 의해 발현된 단백질의 분리 또는 정제 방법으로는 전기영동, 원심분리, 겔 여과, 침전, 투석, 크로마토그래피(이온교환크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 면역흡착 친화력 크로마토그래피, 역상 HPLC, 겔 침투 HPLC), 등전성 포커스 및 이의 다양한 변화 또는 복합 방법을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 한편, 본 발명에서 재조합 균주의 파쇄물로부터 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 분리하는 단계는 바람직하게는 펩티드 태그를 이용한 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의해 수행될 수 있다. 상기 펩티드 태그로는 HA 태그, FLAG 태그, His 태그, BCCP (biotin carboxyl carrier protein), c-myc 태그, V5 태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라아제 (GST) 또는 MBP(maltose binding protein) 등과 같이 공지의 다양한 태그를 사용할 수 있으며, 이중 His 태그인 것이 바람직하다. His-태깅된 단백질은 Ni-NTA(니켈-니트릴로트리아세트산) 수지의 칼럼 상에 특이적으로 트랩핑되며, EDTA 또는 이미다졸에 의해 용출될 수 있다.

[45]

[46] 본 발명의 또 다른 측면은 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 방법 또는 과당으로부터 알룰로스를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들에 관한 것이다. 상기 과당으로부터 알루로스스를 제조하기 위해 필요한 다양한 요소들로는 알룰로스 생산용 조성물이 있다.

[47] 상기 알룰로스 생산용 조성물의 일 예는 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 포함한다. 또한,

상기 알룰로스 생산용 조성물의 다른 예는 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질전환되거나 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물 또는 상기 재조합 균주의 파쇄물을 포함한다. 이때, 상기 알룰로스 생산용 조성물은 바람직하게는 망간 이온, 니켈 이온 및 코발트 이온으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 더 포함할 수 있고, 더 바람직하게는 니켈 이온 또는 코발트 이온을 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 신규 알룰로스 에피머화 효소 변이체는 금속 이온에 의해 활성화가 조절되는 금속효소(metalloenzyme) 특성을 나타내며, 상기 효소에 의한 반응을 니켈 이온 또는 코발트 이온과 같은 특정 금속 이온의 존재 하에서 수행함으로써 알룰로스의 생산 수율을 증가시킬 수 있다.

[48] 또한, 상기 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 방법의 일 예는 과당을 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 의해 형질전환 되거나 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 상기 재조합 균주의 파쇄물 또는 이들 중 어느 하나 이상을 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함한다. 또한, 상기 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 방법은 금속 이온을 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 금속 이온의 종류는 전술한 바와 같다. 일 예로, 상기 금속 이온은 기질인 과당에 첨가되거나, 효소 변이체와 과당의 혼합물에 첨가될 수 있다. 또한, 다른 예로 상기 금속 이온은 효소 변이체가 고정화된 담체에 첨가되거나(과당 첨가 전), 상기 효소 변이체가 고정화된 담체와 과당의 혼합물에 첨가되거나(과당 첨가 후), 또는 과당 첨가시에 과당과 혼합물의 형태로 첨가될 수 있다. 재조합 균주를 사용하는 경우, 상기 금속 이온이 배양물에 첨가되거나 금속 이온이 첨가된 배양 배지에서 배양이 수행될 수도 있다. 또한, 상기 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 방법에서 상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체 또는 상기 재조합 균주는 바람직하게는 담체에 고정화된다. 상기 담체는 고정된 효소의 활성이 장기간 유지될 수 있는 환경을 조성할 수 있는 것으로, 효소 고정화 용도로 사용할 수 있는 공지된 모든 담체에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 담체로 알긴산나트륨(soduim alginate)을 사용할 수 있다. 알긴산나트륨은 해조류의 세포벽에 풍부하게 존재하는 천연 콜로이드성 다당류로, 만누로닉산(β-D-mannuronic acid)과 글루로닉산(α-L-gluronic acid)이 조성되어 있고, 함량 면에서는 무작위로 베타-1,4 결합을 이루어 형성되어, 균주 또는 효소를 안정적으로 고정시킬 수 있고 알룰로스 수율 측면에서 유리할 수 있다. 일 예로, 알룰로스의 수율을 보다

증진시키기 위하여 1.5 내지 4.0%(w/v) 농도의 알긴산나트륨 용액(예컨대, 알긴산나트륨 수용액), 바람직하게는 약 2.5%의 (w/v) 농도의 알긴산나트륨 용액을 재조합 균주의 고정화에 사용할 수 있다. 또한, 상기 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 방법에서 반응 온도는 60~70℃, 바람직하게는 60~67℃, 효소 변이체의 안정성 및 최대 활성을 고려할 때 더 바람직하게는 62~65℃의 범위이고, 반응 pH는 6.5~8, 바람직하게는 6.5~7.5, 더 바람직하게는 6.5~7의 범위이다. 또한, 상기 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 방법에서 과당의 농도는 특별히 제한되지 않으나, 생산성 내지 경제성을 고려할 때 전체 반응물을 기준으로 1~75%(w/w)인 것이 바람직하고, 4~35%(w/w)인 것이 더 바람직하다. 또한, 상기 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 방법에서 사용되는 효소 변이체의 농도는 전체 반응물 기준으로 0.001~0.1 ㎎/㎖, 바람직하게는 0.01~0.1 ㎎/㎖, 더 바람직하게는 0.02~0.05 ㎎/㎖일 수 있다. 또한, 재조합 균주를 이용하여 과당으로부터 알룰로스를 제조하는 경우 상기 재조합 균주의 숙주 균주는 식품학적으로 안전한 균주인 것이 바람직하다. 상기 식품학적으로 안전한 균주는 일반적으로 안전한 것으로 인정되는 GRAS(generally accepted as safe)급 균주를 의미하며, 예를 들어 사카로마이세스속 균주(*Saccharomyces* sp.), 바실러스속 균주(*Bacillus sp.*), 코리네박테리움속 균주(*Corynebacterium* sp.) 등에서 선택될 수 있다. 상기 균주들은 사료, 의약품 및 식품 등의 분야에서 다양한 용도를 갖는 화학물질을 생산하는 산업용 미생물이다. 이러한 균주들은 유전자 조작 및 대량 배양에 용이하거나, 다양한 공정 조건에서 높은 안정성을 가지는 균주이다. 또한, 이러한 균주들은 다른 세균에 비하여 상대적으로 단단한 세포막 구조를 보유하고 있기 때문에 높은 당 농도 등에 의한 삼투압의 영향 하에서도 균체가 안정적인 상태로 존재하는 생물학적 특성을 보인다. 상기 GRAS(generally accepted as safe)급 균주의 구체적인 예로는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) 등이 있다.

[49]

[50] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 보호범위를 제한하는 것은 아니다.

[51]

[52] **실시예 1 : D-알룰로스 3-에피머화 효소의 전환율 및 열 안정성 향상을 위한 아미노산 치환 위치 탐색**

[53] 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)로부터 유래한 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성 향상을 위해 단백질 구조 예측에 기반하여 아미노산 치환 위치를 선정하였다. 상기 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)로부터 유래한 D-알룰로스 3-에피머화 효소(또는 D-사이코스 3-에피머화 효소)는 본원발명의 출원인이

이전에 출원하여 등록받은 대한민국 등록특허 제10-1473918호(2014.12.11)에 개시되어 있다. 상기 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)로부터 유래한 D-알룰로스 3-에피머화 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지고 중성 이하의 pH 조건에서 과당의 알룰로스로의 전환에 대해 최대 활성을 가지며 짧은 시간에 높은 수율로 과당으로부터 알룰로스의 대량 생산이 가능하나 오염 방지 등을 위해 고온 조건에서 효소 반응을 진행하는 경우 활성이 급격이 감소하는 문제가 있다. 본 발명의 발명자들은 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*)로부터 유래한 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성을 향상시키기 위해 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유래 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 아미노산 서열을 기반으로 호몰로지 모델링 기법을 이용하여 단백질 구조를 예측하고, 아미노산 치환 위치를 탐색하였다. 상기 호몰로지 모델링은 Robetta 서버를 이용하여 수행되었고, 단백질 구조 예측 및 분석은 Coot, PyMol, UCSF Chimera와 같은 소프트웨어 프로그램을 이용하여 수행되었다. D-알룰로스 3-에피머화 효소의 3차원 구조 모델 분석을 통해 화학 결합의 변화시 전환율 및 열 안정성 향상과 관련될 것으로 예상되는 총 7개의 아미노산 잔기 위치 및 상기 위치로 치환될 아미노산 잔기를 선정하였다. 도 1은 본 발명의 발명자들이 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유래 D-알룰로스 3-에피머화 효소의 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성 향상시키기 위해 치환 후보로 선정한 총 7개의 아미노산 잔기 위치를 나타낸 것이다. 도 1에서 "W29"는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 29번째 위치에 존재하는 트립토판(Trp)을 나타내고, "C35"는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 35번째 위치에 존재하는 시스테인(Cys)을 나타내고, "D79"는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 79번째 위치에 존재하는 아스파트산(Asp)을 나타내고, "V109"는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 109번째 위치에 존재하는 발린(Val)을 나타내고, "M199"는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 199번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)을 나타내고, "N218"은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 218번째 위치에 존재하는 아스파라진(Asn)을 나타내고, "M234"는 서열번호 1의 아미노산 서열 중 234번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)을 나타낸다. 또한, 도 1에 도시되어 있지는 않으나, 선행연구 결과로부터 서열번호 1의 아미노산 서열 중 216번째 위치에 존재하는 글리신(Gly)을 "G216"으로 명명하고 치환 후보로 선정하였다. 또한, 후술하는 바와 같이 서열번호 1의 아미노산 서열 중 29번째 위치에 존재하는 트립토판(Trp)을 라이신(Lys)으로 치환하여 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 W29K를 제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 35번째 위치에 존재하는 시스테인(Cys)을 류신(Leu)으로 치환하여 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 C35L을 제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 79번째 위치에 존재하는 아스파트산(Asp)을 프롤린(Pro)으로 치환하여 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 D79P를

제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 109번째 위치에 존재하는 발린(Val)을 알라닌(Ala)으로 치환하여 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 V109A를 제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 199번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)을 페닐알라닌(Phe)으로 치환하여 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 M199F를 제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 216번째 위치에 존재하는 글리신(Gly)을 세린(Ser)으로 치환하여 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 G216S를 제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 218번째 위치에 존재하는 아스파라진(Asn)을 시스테인(Cys)으로 치환하여 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 N218C를 제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 234번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)을 이소류신(Ile)으로 치환하여 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 M234I를 제작하였다. 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 29번째 위치에 존재하는 트립토판(Trp)을 라이신(Lys)으로 치환하고 동시에 서열번호 1의 아미노산 서열 중 216번째 위치에 존재하는 글리신(Gly)을 세린(Ser)으로 치환하여 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 W29K/G216S를 제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 29번째 위치에 존재하는 트립토판(Trp)을 라이신(Lys)으로 치환하고 동시에 서열번호 1의 아미노산 서열 중 234번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)을 이소류신(Ile)으로 치환하여 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 W29K/M234I를 제작하였고, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 216번째 위치에 존재하는 글리신(Gly)을 세린(Ser)으로 치환하고 동시에 서열번호 1의 아미노산 서열 중 234번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)을 이소류신(Ile)으로 치환하여 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 G216S/M234I를 제작하였다. 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열 중 29번째 위치에 존재하는 트립토판(Trp)을 라이신(Lys)으로 치환하고 서열번호 1의 아미노산 서열 중 216번째 위치에 존재하는 글리신(Gly)을 세린(Ser)으로 치환하고 동시에 서열번호 1의 아미노산 서열 중 234번째 위치에 존재하는 메티오닌(Met)을 이소류신(Ile)으로 치환하여 서열번호 13의 아미노산 서열로 이루어진 효소 변이체 W29K/G216/M234I를 제작하였다.

[54]

[55] **실시예 2 : 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유래 D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체의 과발현을 위한 재조합 벡터 및 재조합 균주 제작**

[56] 플라보니프랙터 플라우티 유래 알룰로스 에피머화 효소의 야생형 폴리뉴클레오티드를 기반으로 overlap extension polymerase chain reaction 방법을 이용하여 효소 변이체 12종(W29K, C35L, D79P, V109A, M199F, G216S, N218C, M234I, W29K/G216S, W29K/M234I, G216S/M234I, W29K/G216S/M234I)의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 제작하였다.

[57] 먼저, 플라보니프랙터 플라우티 유래 알룰로스 에피머화 효소 변이체를

코딩하는 유전자를 제작하기 위해 하기 표 1에 보이는 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 구체적으로, 100μM의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)가 첨가된 반응액에 표 1의 프라이머인 올리고뉴클레오티드 1pM, 템플레이트(주형)로 이용되는 플라보니프랙터 플라우티 유래 알룰로스 에피머화 효소의 야생형 폴리뉴클레오티드(서열번호 14) 100ng을 혼합하고 Thermocycler(TP600, TAKARA BIO Inc., JAPAN)를 이용하여 pfu-X DNA 폴리머라제 혼합물(Bioneer) 1 유니트의 존재 하에 25~30주기로 PCR 반응을 수행하였다.

[58]

[표1]

프라이머 설명	프라이머 염기서열(5'→3')
W29K 순방향 프라이머	CCCTGATGGAGAAGCTGGCCAAACTGGGCTTTGACATCTGCGA
W29K 역방향 프라이머	TCGCAGATGTCAAAGCCCAGTTTGGCCAGCTTCTCCATCAGGG
C35L 순방향 프라이머	CCTGGCTGGGCTTTGACATCCTGGAGGTGGCCTCCGCCGAGTG
C35L 역방향 프라이머	CACTCGGCGGAGGCCACCTCCAGGATGTCAAAGCCCAGCCAGG
D79P 순방향 프라이머	CCAAATACGACCTGGCCAGCCCCGATCCGGCGGTGCGGGAGAA
D79P 역방향 프라이머	TTCTCCCGCACCGCCGGATCGGGGCTGGCCAGGTCGTATTTGG
V109A 순방향 프라이머	GGGCGGCCATCCTCAACGGCGCCTCCTACGCCGGGTGGCAGGC
V109A 역방향 프라이머	GCCTGCCACCCGGCGTAGGAGGCGCCGTTGAGGATGGCCGCCC
M199F 순방향 프라이머	TGAACATCGAGGAGGACAGCTTCGTGGACGCCATTCTGGAGGC
M199F 역방향 프라이머	GCCTCCAGAATGGCGTCCACGAAGCTGTCCTCCTCGATGTTCA
G216S 순방향 프라이머	GGCTGGGGCATTTCCACGTGAGCGAGAACAACCGCCGCCCCGC
G216S 역방향 프라이머	GCGGGGCGGCGGTTGTTCTCGCTCACGTGGAAATGCCCCAGCC
N218C 순방향 프라이머	GGCATTTCCACGTGGGGGAGTGCAACCGCCGCCCCGCCGGCTC
N218C 역방향 프라이머	GAGCCGGCGGGGCGGCGGTTGCACTCCCCCACGTGGAAATGCC
M234I 순방향 프라이머	ACCGCCTGCCCTGGAAGGACATTGCCGCCGCCCTCAAGCAGGT
M234I 역방향 프라이머	ACCTGCTTGAGGGCGGCGGCAATGTCCTTCCAGGGCAGGCGGT

[59] 프라이머 조합을 통해 변이체 단편을 증폭한 뒤, 각각의 쌍을 주형으로 하고 NdeI과 XhoI 제한 효소 인식 부위의 서열이 도입된 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 overlap extentention PCR을 통해 최종적으로 효소 변이체 12종(W29K, C35L, D79P, V109A, M199F, G216S, N218C, M234I, W29K/G216S, W29K/M234I, G216S/M234I, W29K/G216S/M234I)의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 제작하였다. 하기 표 2에 제한 효소 인식 부위의 서열을 도입하기 위해 사용된 프라이머의 염기서열을 나타내었다.

[60] [표2]

프라이머 설명	프라이머 염기서열(5'→3')
NdeI 순방향 프라이머	GCATGCCATATGAACCCGATTGGAATGCA
XhoI 역방향 프라이머	GCATGCCTCGAGCGCGGTCAGCTCCTTGAGGA

[61] 서열번호 15의 염기서열은 효소 변이체 W29K의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 16의 염기서열은 효소 변이체 C35L의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 17의 염기서열은 효소 변이체 D79P의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 18의 염기서열은 효소 변이체 V109A의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 19의 염기서열은 효소 변이체 M199F의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 20의 염기서열은 효소 변이체 G216S의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 21의 염기서열은 효소 변이체 N218C의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 22의 염기서열은 효소 변이체 M234I의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 23의 염기서열은 효소 변이체 W29K/G216S의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 24의 염기서열은 효소 변이체 W29K/M234I의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 25의 염기서열은 효소 변이체 G216S/M234I의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타내고, 서열번호 26의 염기서열은 효소 변이체 W29K/G216S/M234I의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 단편을 나타낸다. 서열번호 15 내지 26의 염기서열은 효소 변이체의 아미노산 서열에 직접 대응되는 염기서열로 구성되어 있고, 편의상 제한 효소 인식 부위의 서열을 생략하였다.

[62] 이후, 제작된 폴리뉴클레오티드 단편을 제한효소 NdeI과 XhoI을 사용하여 발현벡터인 pET28a(Novagen)의 동일한 제한효소 부위에 삽입하여 재조합 발현벡터 12종을 제작하였다. 또한, 열충격(heat shock) 방법(Sambrook and Russell: Molecular Cloning. 참조)을 사용하여 대장균 BL21(DE3)(invitrogen)에 재조합

발현 벡터를 도입시켜 형질전환하고, 재조합 대장균 12종을 제작하였다. 제작한 재조합 대장균에 60% 글리세린 용액을 첨가하고, 효소 발현을 위한 배양을 실시하기 전에 -70℃에서 냉동 보관하였다.

[63]

[64] **실시예 3 : 플라보니프랙터 플라우티(*Flavonifractor plautii*) 유래 D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체의 발현 및 정제**

[65] 하기 표 3의 조성(배지 1L 기준)을 가진 단백질 발현용 배지 150㎖가 수용된 1L 용량의 플라스크에 실시예 2에서 제작한 재조합 대장균 1㎖를 접종하고 진탕 배양기로 32℃의 온도 조건 및 140 rpm의 진탕 조건을 유지하면서 24 hr 동안 배양하였다. 배지에 포함된 1% 락토스(Lactose)로 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 과발현을 유도하였다.

[66] [표3]

배지 성분	함량	배지 성분	함량
글리세롤(Glycerol)	9.0 중량%	$MgSO_4$	0.1 중량%
락토스(Lactose)	1.0 중량%	$FeSO_4$	10.0 ppm
$(NH_4)_2SO_4$	0.6 중량%	$MnSO_4$	10.0 ppm
KH_2PO_4	0.5 중량%	$ZnSO_4$	10.0 ppm
YPA	1.5 중량%	소포제(네오린)	1.0 drop

[67] 이후, 과발현된 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 먼저, 재조합 대장균의 배양액을 4100×g 및 4℃의 조건에서 약 15분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 재조합 대장균의 균체를 회수하였다. 이후, 회수된 재조합 대장균의 균체를 lysis buffer(50mM 제1인산칼륨, 300mM 염화칼륨, 5mM 이미다졸 함유)에 현탁시킨 후 초음파 파쇄기(Sonicator)로 처리하여 세포를 파쇄하였다. 이후, 세포 파쇄액을 15,814×g 및 4℃의 조건에서 약 10분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 제거하고 상등액만을 회수하였다. 이후, 히스티딘 태그(His-tag) 친화 크로마토그래피 컬럼 및 탈염(desalting) 컬럼을 이용해 회수한 상등액으로부터 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 함유한 정제 효소액을 분리하였다.

[68]

[69] **실시예 4 : D-알룰로스 3-에피머화 효소 변이체의 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성 확인**

[70] 플라보니프랙터 플라우티 유래 알룰로스 에피머화 효소의 야생형 및 변이체의 과당의 알룰로스로의 전환율 및 열 안정성을 확인하기 위해 효소를 고온에 일정 시간 동안 노출시킨 후 과당의 알룰로스로의 전환 활성이 감소하는 정도를 분석하였다. 구체적으로 실시예 3에서 수득한 정제 효소액(효소 농도 1 ㎎/㎖)을 62℃의 항온 수조에서 0 hr, 1 hr 및 2 hr 동안 보관하여 열처리 하였다. 이후,

4%(w/w) 과당 및 1mM 황산니켈($NiSO_4$)의 금속 이온이 포함된 50 mM PIPES 완충용액(pH 7.0)에 열처리된 정제 효소액을 효소 농도가 25 ㎍/㎖가 되도록 첨가하고 진탕 항온 수조(VS-1205SW1, 비전과학)를 이용하여 65℃의 온도 조건 및 120 rpm의 진탕 조건에서 25분 동안 반응시켰다. 이후, 반응 생성액의 온도를 4℃로 낮추어 반응을 정지시키고 16,600×g 및 4℃의 조건에서 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 이후, 당 분석 컬럼(Benson, 미국)이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템(SP930D pump, 영린기기; MIDAS 자동시료주입기, Spark Holland 社) 및 굴절지수 검출기(2414 refractive index detector, Waters 社)를 이용하여 상등액 내 알룰로스 농도 및 과당 농도를 측정하고, 측정된 결과로부터 과당의 알룰로스로의 전환율을 계산한 후, 전환율을 효소 활성의 지표로 사용하였다.

[71] 하기 표 4 및 표 5에 플라보니프랙터 플라우티 유래 알룰로스 에피머화 효소의 야생형 및 변이체를 열처리 하였을 때 열처리 조건별 과당의 알룰로스로의 전환율을 나타내었다.

[72] [표4]

62℃에서의 열처리 시간	알룰로스 에피머화 효소 야생형 및 변이체의 열처리 시간별 과당의 알룰로스로의 전환율(%)						
	야생형	W29K	C35L	D79P	V109A	M199F	G21GS
0 hr	17.8	20.9	16.3	18.1	1.0	16.4	17.6
1 hr	4.9	9.4	1.8	0.4	0.1	2.6	12.4
2 hr	2.4	5.3	0.0	0.3	0.0	0.7	7.7

[73]

[74] [표5]

62℃에서의 열처리 시간	알룰로스 에피머화 효소 야생형 및 변이체의 열처리 시간별 과당의 알룰로스로의 전환율(%)					
	N218C	M234I	W29K/G216S	W29K/M234I	G216S/M234I	W29K/G216G/M234I
0 hr	14.3	19.5	21.6	22.3	20.7	23.9
1 hr	1.3	7.5	13.2	17.4	17.1	20.7
2 hr	0.2	3.8	7.9	13.3	12.2	14.9

[75]

[76] 상기 표 4에서 보이는 바와 같이 플라보니프랙터 플라우티 유래 알룰로스 에피머화 효소 야생형의 아미노산 잔기 1개를 다른 아미노산 잔기로 치환한 알룰로스 에피머화 효소 변이체 중 W29K, G216S, M234I는 알룰로스 에피머화

효소 야생형(Wild type)과 비교했을 때 열처리와 상관없이 과당의 알룰로스로의 전환 활성이 야생형과 거의 동일하거나 더 높았고, 특히 현저하게 향상된 열 안정성을 나타내었다. 또한, 플라보니프랙터 플라우티 유래 알룰로스 에피머화 효소 야생형의 아미노산 잔기 2개를 다른 아미노산 잔기로 치환한 알룰로스 에피머화 효소 변이체 중 W29K/M234I는 열처리와 상관없이 과당의 알룰로스로의 전환 활성 및 열 안정성이 매우 우수하였다. 또한, 플라보니프랙터 플라우티 유래 알룰로스 에피머화 효소 야생형의 아미노산 잔기 3개를 다른 아미노산 잔기로 치환한 알룰로스 에피머화 효소 변이체 W29K/G216S/M234I는 열처리와 상관없이 과당의 알룰로스로의 전환 활성 및 열 안정성이 가장 우수하였다.

[77]

[78] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 2의 아미노산 서열, 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 13의 아미노산 서열에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 알룰로스 에피머화 효소 변이체.

[청구항 2] 제1항의 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 15의 염기 서열, 서열번호 24의 염기 서열 또는 서열번호 26의 염기 서열에서 선택된 어느 하나의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

[청구항 4] 제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

[청구항 5] 제4항의 재조합 벡터 중 어느 하나에 의해 형질전환된 재조합 균주.

[청구항 6] 제5항의 재조합 균주를 배양하여 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 발현시키는 단계; 및
상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체가 발현된 재조합 균주의 파쇄물로부터 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 분리하는 단계를 포함하는 알룰로스 에피머화 효소 변이체의 제조방법.

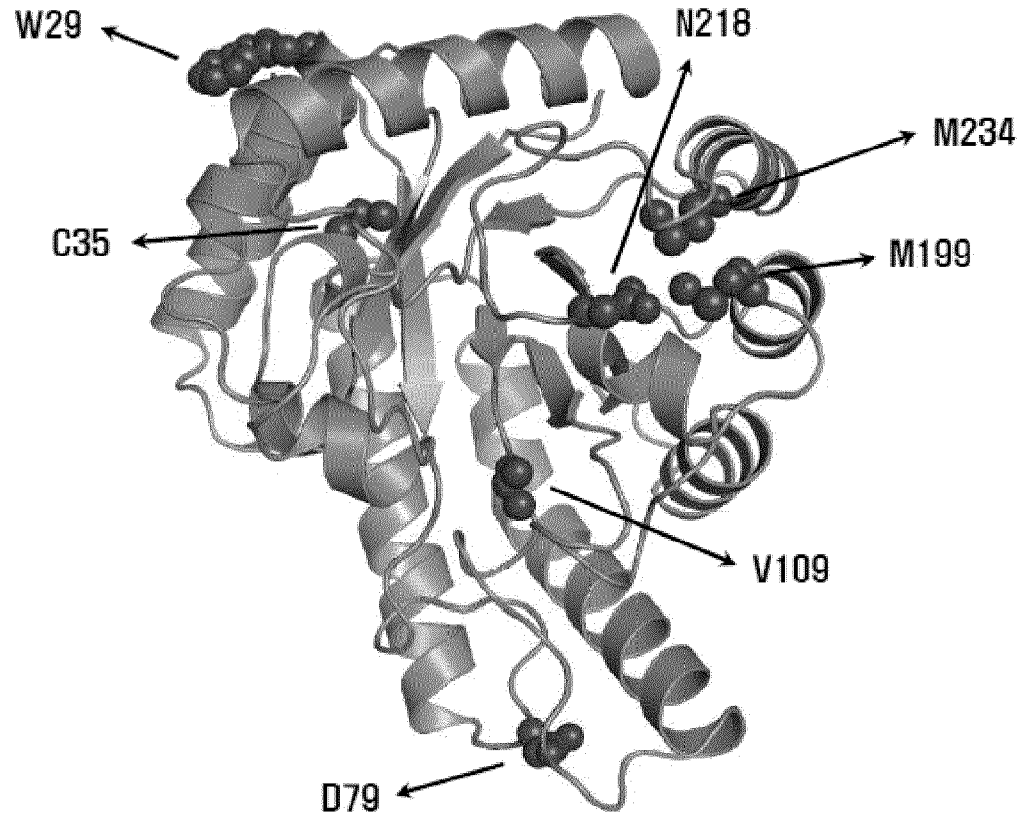
[청구항 7] 제1항의 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 포함하는 알룰로스 생산용 조성물.

[청구항 8] 제5항의 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물 또는 상기 재조합 균주의 파쇄물을 포함하는 알룰로스 생산용 조성물.

[청구항 9] 과당을 제1항의 알룰로스 에피머화 효소 변이체 또는 상기 알룰로스 에피머화 효소 변이체를 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 알룰로스의 제조방법.

[청구항 10] 과당을 제5항의 재조합 균주, 상기 재조합 균주의 배양물, 상기 재조합 균주의 파쇄물 또는 이들 중 어느 하나 이상을 포함하는 조성물과 반응시키는 단계를 포함하는 알룰로스의 제조방법.

[도1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/005276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/195(2006.01)i; **C12N 9/90**(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i; **C12P 19/02**(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)

C07K 14/195(2006.01); C12N 1/20(2006.01); C12N 15/61(2006.01); C12N 9/90(2006.01); C12N 9/92(2006.01); C12P 19/02(2006.01)

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: 알룰로스(allulose), 사이코스(psicose), 에피머화효소(epimerase), 변이(mutation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1473918 B1 (DAESANG CORPORATION) 17 December 2014 (2014-12-17) See abstract; and claims 1-25.	1-10
A	KR 10-1203856 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 21 November 2012 (2012-11-21) See abstract; and claims 1-8.	1-10
A	KR 10-1455759 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 28 October 2014 (2014-10-28) See abstract; claims 1-14; and paragraphs [0009]-[0010].	1-10
A	ZHU, Z. et al. Redesign of a novel d-allulose 3-epimerase from Staphylococcus aureus for thermostability and efficient biocatalytic production of d-allulose. Microbial Cell Factories. 2019, vol. 18, thesis no. 59, pp. 1-10. See abstract.	1-10
A	KR 10-2019-0012243 A (SAMYANG CORPORATION) 08 February 2019 (2019-02-08) See entire document.	1-10

☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
29 July 2021	**29 July 2021**

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**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/005276

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/005276

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-1473918 B1	17 December 2014	CN 106164265 A	23 November 2016
		CN 106164265 B	25 October 2019
		EP 3135762 A1	01 March 2017
		EP 3135762 B1	10 July 2019
		JP 2017-510302 A	13 April 2017
		JP 6320621 B2	09 May 2018
		US 2017-0101637 A1	13 April 2017
		US 9988618 B2	05 June 2018
		WO 2015-182937 A1	03 December 2015
KR 10-1203856 B1	21 November 2012	CN 104160023 A	19 November 2014
		DK 2749645 T3	21 August 2017
		EP 2749645 A2	02 July 2014
		EP 2749645 B1	26 April 2017
		EP 3192867 A1	19 July 2017
		JP 2014-525244 A	29 September 2014
		PT 2749645 T	28 July 2017
		SI 2749645 T1	31 August 2017
		US 2014-0199732 A1	17 July 2014
		US 9217166 B2	22 December 2015
		WO 2013-027999 A2	28 February 2013
		WO 2013-027999 A3	10 May 2013
KR 10-1455759 B1	28 October 2014	CA 2910625 A1	30 October 2014
		CN 105164255 A	16 December 2015
		CN 105164255 B	20 March 2018
		DK 2990483 T3	19 March 2018
		EP 2990483 A1	02 March 2016
		EP 2990483 B1	13 December 2017
		JP 2016-518135 A	23 June 2016
		JP 6200578 B2	20 September 2017
		MX 2015014720 A	10 June 2016
		US 2016-0152967 A1	02 June 2016
		US 9938515 B2	10 April 2018
		WO 2014-175655 A1	30 October 2014
KR 10-2019-0012243 A	08 February 2019	AU 2016-368075 A1	15 June 2017
		AU 2016-368075 B2	05 March 2020
		CN 108603209 A	28 September 2018
		EP 3388526 A1	17 October 2018
		JP 2018-536417 A	13 December 2018
		JP 2021-045137 A	25 March 2021
		JP 6846425 B2	24 March 2021
		KR 10-1944103 B1	30 January 2019
		US 2020-0399721 A1	24 December 2020
		WO 2017-099418 A1	15 June 2017

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/005276

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/195(2006.01)i; **C12N 9/90**(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i; **C12P 19/02**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/195(2006.01); C12N 1/20(2006.01); C12N 15/61(2006.01); C12N 9/90(2006.01); C12N 9/92(2006.01); C12P 19/02(2006.01)

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: 알룰로스(allulose), 사이코스(psicose), 에피머화효소(epimerase), 변이(mutation)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1473918 B1 (대상 주식회사) 2014.12.17 요약; 청구항 1-25	1-10
A	KR 10-1203856 B1 (씨제이제일제당 (주)) 2012.11.21 요약; 청구항 1-8	1-10
A	KR 10-1455759 B1 (씨제이제일제당(주)) 2014.10.28 요약; 청구항 1-14; 단락 [0009]-[0010]	1-10
A	ZHU, Z. 등, `Redesign of a novel d-allulose 3-epimerase from Staphylococcus aureus for thermostability and efficient biocatalytic production of d-allulose', Microbial Cell Factories, 2019, 18권, 논문번호 59, 페이지 1-10 초록	1-10
A	KR 10-2019-0012243 A (주식회사 삼양사) 2019.02.08 전체 문헌	1-10

☐ 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
2021년07월29일(29.07.2021)	**2021년07월29일(29.07.2021)**

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

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/005276

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
      - ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
      - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/005276

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1473918 B1	2014/12/17	CN 106164265 A	2016/11/23
		CN 106164265 B	2019/10/25
		EP 3135762 A1	2017/03/01
		EP 3135762 B1	2019/07/10
		JP 2017-510302 A	2017/04/13
		JP 6320621 B2	2018/05/09
		US 2017-0101637 A1	2017/04/13
		US 9988618 B2	2018/06/05
		WO 2015-182937 A1	2015/12/03
KR 10-1203856 B1	2012/11/21	CN 104160023 A	2014/11/19
		DK 2749645 T3	2017/08/21
		EP 2749645 A2	2014/07/02
		EP 2749645 B1	2017/04/26
		EP 3192867 A1	2017/07/19
		JP 2014-525244 A	2014/09/29
		PT 2749645 T	2017/07/28
		SI 2749645 T1	2017/08/31
		US 2014-0199732 A1	2014/07/17
		US 9217166 B2	2015/12/22
		WO 2013-027999 A2	2013/02/28
		WO 2013-027999 A3	2013/05/10
KR 10-1455759 B1	2014/10/28	CA 2910625 A1	2014/10/30
		CN 105164255 A	2015/12/16
		CN 105164255 B	2018/03/20
		DK 2990483 T3	2018/03/19
		EP 2990483 A1	2016/03/02
		EP 2990483 B1	2017/12/13
		JP 2016-518135 A	2016/06/23
		JP 6200578 B2	2017/09/20
		MX 2015014720 A	2016/06/10
		US 2016-0152967 A1	2016/06/02
		US 9938515 B2	2018/04/10
		WO 2014-175655 A1	2014/10/30
KR 10-2019-0012243 A	2019/02/08	AU 2016-368075 A1	2017/06/15
		AU 2016-368075 B2	2020/03/05
		CN 108603209 A	2018/09/28
		EP 3388526 A1	2018/10/17
		JP 2018-536417 A	2018/12/13
		JP 2021-045137 A	2021/03/25
		JP 6846425 B2	2021/03/24
		KR 10-1944103 B1	2019/01/30
		US 2020-0399721 A1	2020/12/24
		WO 2017-099418 A1	2017/06/15