

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2014년 12월 4일 (04.12.2014)



(10) 국제공개번호  
WO 2014/193052 A1

- (51) 국제특허분류:  
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)  
C12N 15/61 (2006.01) C12N 15/77 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/009641
- (22) 국제출원일: 2013년 10월 28일 (28.10.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2013-0060703 2013년 5월 28일 (28.05.2013) KR
- (71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김선원 (KIM, Seon Won); 660-712 경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61 남강휴먼빌아파트 101-1404, Gyeongsangnam-do (KR). 장희정 (JANG, Hui

Jeong); 660-290 경상남도 진주시 주약동 110-10 #305, Gyeongsangnam-do (KR). 이현서 (LEE, Hyeon Seo); 621-916 경상남도 김해시 어방동 어방아파트 205-304, Gyeongsangnam-do (KR). 윤상활 (YOON, Sang Hwal); 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교, Gyeongsangnam-do (KR).

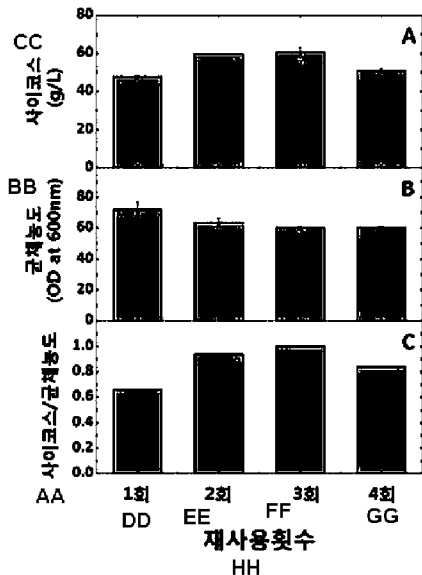
(74) 대리인: 이준호 (LEE, Joon Ho) 등; 137-953 서울시 서초구 서초중앙로 53 6층 (서초동, 대림빌딩), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CORYNEBACTERIUM INCLUDING POLYNUCLEOTIDE FOR CODING PSICOSE 3-EPIMERASE ENZYME AND METHOD FOR PRODUCING PSICOSE BY USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 사이코스 3-에피머라제 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코리네박테리움 및 이를 이용한 사이코스의 생산 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a corynebacterium including a polynucleotide for coding a psicose 3-epimerase enzyme, and a method for producing psicose by using the same, and more specifically, to: a corynebacterium including a polynucleotide for coding a psicose 3-epimerase enzyme having a catalytic activity for the conversion of fructose into psicose, wherein the polynucleotide can mass-produce psicose from fructose safely and efficiently by coding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1; and a method for producing psicose using the same.

(57) 요약서: 본 발명은 사이코스 3-에피머라제 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코리네박테리움 및 이를 이용한 사이코스의 생산 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩함으로써, 안전하면서도 높은 효율로 과당으로부터 사이코스를 대량 생산할 수 있는, 사이코스 3-에피머라제 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코리네박테리움 및 이를 이용한 사이코스의 생산 방법에 관한 것이다.

- AA ... Psicose/ microbial cell density
- BB ... Microbial cell density (OD at 600nm)
- CC ... Psicose (g/L)
- DD ... First time
- EE ... Second time
- FF ... Third time
- GG ... Fourth time
- HH ... Reuse frequency

WO 2014/193052 A1



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

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

## 명세서

### 발명의 명칭: 사이코스 3-에피머라제 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코리네박테리움 및 이를 이용한 사이코스의 생산 방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 사이코스 3-에피머라제 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코리네박테리움 및 이를 이용한 사이코스의 생산 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 사이코스 (D-psicose)는 과당 (D-fructose)의 3번 탄소의 에피머 (epimer)로써 일반 당류들처럼 감미를 가지지만 인체 내에서 대사가 되지 않아서 거의 칼로리는 제로에 가까워 당뇨 및 비만환자에게 설탕 대체 기능성 감미료로 사용될 수 있는 기능성 당이다. 또한 간에서의 지질합성에 관여하는 효소 활성을 억제해서 복부비만을 감소시키는 기능을 가지고 있고 당뇨병과 동맥경화 치료제로 현재 연구 중에 있는 당이다.
- [3] 이처럼 사이코스는 감미료로 각광받으면서 식품 산업 분야에 있어 사이코스를 효율적으로 생산할 수 있는 방법에 대한 개발의 필요성이 점점 높아지고 있다. 사이코스는 천연물질 내에는 당밀 처리 과정 또는 포도당 이성화 반응과정 중에 매우 소량 존재하기에 기존의 사이코스 생산은 주로 화학적 과정을 거쳐 이루어졌다. 빌릭 (Bilik)등은 몰리브딕산(molybdic acid) 이온의 촉매작용을 활용하여 과당으로부터 사이코스를 생산하는 기술을 개발하였다. 맥도날드 (McDonald)는 1,2:4,5-디-*o*-이소프로필리덴-베타-D-프락토피라노스 (1,2:4,5-di-*o*-isopropylidene-bata-D-fructopyranose)로부터 3단계의 화학적 처리과정으로 사이코스를 생산하였다. 또한, 도너 (Doner)는 에탄올과 트리에틸아민과 함께 과당을 가열하는 방법으로 사이코스를 생산하였다. 그러나, 이들 화학적 방법에 의한 사이코스 생산은 비용이 많이 소모되는 반면 그 생산효율은 낮고 또한 부산물의 과량 발생한다는 문제점이 있다.
- [4] 생물학적 방법에 의한 사이코스 생산방법으로 이즈모리 (Ken Izumori)등은 미생물 세포반응을 활용하여 갈락시톨 (galacitol), 디-타가토스 (D-tagatose) 또는 디-탈리톨 (D-talitol) 등으로부터 사이코스를 생산할 수 있다는 것을 보였다. 그러나, 이 기질들 또한 자연계에서 비교적 희귀한 당 또는 당알코올로 그 원가가 높다는 단점이 있다.
- [5] 효소 전환방법으로는 분리미생물 슈도모나스 치코리 ST-24 (*Pseudomonas cichorii* ST-24)의 디-타가토스-3-에피머화 효소 (D-tagatose-3-epimerase)를 재조합 대장균에서 생산하고 정제하여 과당을 사이코스로 효소 전환하는 방법이 있으며, 이즈모리 등은 디-타가토스-3-에피머화 효소를 고정화시킨 반응시스템으로 약 25%의 전환율로 사이코스를 생산한 바 있다.

- [6] 이러한 종래 기술에 의하면, 과당으로부터 사이코스를 생산하기 위해서 효소를 정제하고 그 정제된 효소를 고정화하여 사이코스 생산성을 높이는 방향으로 연구되어왔다. 이처럼 효소를 정제하는 과정에는 시간 및 비용이 많이 요구되는 것이 현실이다.
- [7] 따라서, 효소 정제의 과정을 생략하여 제조원가가 낮고 사이코스를 높은 효율로 생산할 수 있는 균주 및 이를 이용하여 사이코스를 생산하는 방법이 요구되고 있다.
- [8] 한국공개특허 제2006-125971호에는 사이코스 에피머화 효소에 의한 사이코스의 생산 방법이 개시되어 있다.

[9]

[10] <선행기술문헌>

[11] <특허문헌>

[12] 한국공개특허 제2006-125971호

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

- [13] 본 발명은 고효율의 사이코스 생성 효율을 갖는, 사이코스 3-에피머라제 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코리네박테리움을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [14] 본 발명은 그로부터 안전하면서도 높은 효율로 사이코스를 대량생산할 수 있는 사이코스의 생산 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제 해결 수단

- [15] 1. 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 코리네박테리움속 미생물.
- [16] 2. 위 1에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 것인 미생물.
- [17] 3. 위 1에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 것인 미생물.
- [18] 4. 위 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 미생물 내에 그 자체로 또는 벡터를 이용하여 도입되는, 미생물.
- [19] 5. 위 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자 및 서열번호 3의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자 중 적어도 하나를 결손 또는 불활성화시킨, 미생물.
- [20] 6. 위 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 ptsF 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 mtlD 중 적어도 하나를 결손 또는 불활성화시킨, 미생물.
- [21] 7. 위 1 내지 3 중 어느 한 항의 미생물을 과당을 포함하는 배지에서 배양하는

단계; 및 상기 미생물의 배양물로부터 사이코스를 회수하는 단계를 포함하는 사이코스의 생산 방법.

- [22] 8. 위 7에 있어서, 과당은 1%(w/v) 내지 80%(w/v)의 농도인, 방법.
- [23] 9. 위 7에 있어서, 상기 배지는 영양배지 또는 구멍배지인, 방법.
- [24] 10. 위 7에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계 이전에 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 미생물을 과당을 포함하지 않는 배지에서 배양하여 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및 상기 미생물의 배양물로부터 미생물을 회수하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [25] 11. 위 10에 있어서, 상기 회수한 미생물을 과당을 포함하는 배지에  $OD_{600}$ 이 0.01 내지 300이 되도록 하는 농도로 접종하여 배양하는, 방법.
- [26] 12. 위 11에 있어서, 과당을 포함하는 배지의 과당 농도는 1%(w/v) 내지 80%(w/v)인, 방법.
- [27] 13. 위 7에 있어서, 상기 미생물의 배양물로부터 미생물을 회수하여, 분리된 미생물을 다시 과당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [28] 14. 위 13에 있어서, 상기 분리된 미생물을 과당을 포함하는 배지에  $OD_{600}$ 이 5 내지 150이 되도록 하는 농도로 접종하여 배양하는, 방법.
- [29] 15. 위 13에 있어서, 과당을 포함하는 배지의 과당 농도는 10%(w/v) 내지 80%(w/v)인, 방법.

### 발명의 효과

- [30] 본 발명의 미생물은 안전하면서도 높은 효율로 과당으로부터 사이코스를 대량 생산할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 사이코스 3-에피머라제를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체로부터 사이코스 생산량을 측정된 결과이다. 회색막대는 24시간의 사이코스 생산결과이며, 진회색막대는 48시간의 사이코스 생산결과이다.
- [32] 도 2는 사이코스 3-에피머라제를 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환 균체를 4회 회수하여 재배양하면서 사이코스 생산량을 측정된 결과이다. 패널 A는 사이코스 생산량을 나타낸 결과이며, 패널 B는 균체의 농도를 나타낸 결과이며, 패널 C는 사이코스 생산량을 균체 농도의 값으로 나누어 표현한 결과이다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [33] 본 발명은 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩함으로써, 안전하면서도 높은 효율로 과당으로부터 사이코스를 대량 생산할 수 있는, 코리네박테리움속 미생물 및 이를 이용한 사이코스의 생산 방법에 관한 것이다.

- [34]
- [35] 본 명세서에는 한국특허출원번호 10-2013-0060703의 명세서 및 도면에 기재되어 있는 모든 내용이 참조로 포함된다.
- [36] 본 발명의 코리네박테리움속 미생물은 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩한다.
- [37] 서열번호 1의 아미노산 서열은 MKHGIYYSYW EHEWSAKFGP YIEKVAKLGF DII EVA AHHI NEYSDAELAT IRKSAKDNGI ILTAGIGPSK TKNLSSDAA VRAAGKAFFE RTLSNVAKLD IHTIGGALHS YWPIDYSQPV DKAGDYARGV EGINGIADFA NDLGINLCIE VLNRFENHVL NTAAEGVAFV KDVGKNNVKV MLDTFHMNIE EDSFGDAIRT AGPLLGHFHT GESNRRVPGK GRMPWHEIGL ALRDINYTGA VIMEPFVKTG GTIGSDIKVW RDLSSGGADIA KMDEDARNAL AFSRFVLGG이다.
- [38] 본 발명의 코리네박테리움속 미생물은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이라면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 코리네박테리움 글루타미쿰, 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, taxid: 196627; GenBank NID: NC\_003450, ATCC13032)에 상기 폴리뉴클레오티드를 도입시킨 것일 수 있다.
- [39] 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032는 국제 기탁 기관인 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, USA)에 기탁되어 있으므로 분양받아 사용할 수 있다.
- [40] 코리네박테리움 글루타미쿰은 GRAS(Generally recognized as safe) 균주이고, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 경우, 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 우수한 효율로 제조할 수 있어, 과당의 사이코스로의 전환율이 매우 우수하다.
- [41] 상기 효소는 아그로박테리움 투메파시엔스로부터 유래된 효소일 수 있다.
- [42] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩한다.
- [43] 상기 폴리뉴클레오티드는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의하여 도입되는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드 자체로 또는 벡터에 의하여 도입되는 것일 수 있다.
- [44] 용어 "벡터"란 연결되어 있는 다른 핵산을 전달할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 특정한 유전자의 도입을 매개하는 핵산 서열이라는 관점에서, 본 발명에서 벡터는, 핵산 구조체, 및 카세트와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있는 것으로 해석된다.
- [45] 벡터에는 예를 들면 플라스미드 또는 바이러스 유래 벡터 등이 포함된다. 플라스미드란 추가의 DNA가 연결될 수 있는 원형의 이중가닥 DNA 고리를 말한다. 본 발명에서 사용되는 벡터에는 예를 들면, 플라스미드 발현벡터, 플라스미드 셔틀벡터, 바이러스 발현벡터(예, 복제결합 레트로바이러스 벡터,

레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터 등) 및 이들과 동등한 기능을 수행할 수 있는 바이러스 벡터가 포함되나 이들에 한정되는 것은 아니다.

- [46] 상기 폴리뉴클레오티드는 프로모터 및 전사종결인자로 이루어지는 하나 이상의 요소와 작동가능하게 연결되어 있는 것일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 조절 요소 (regulatory element)와 작동가능하게 연결된 것일 수 있다. 예를 들면, 상기 조절 요소는 화학물질 유도성 요소 (inducible element) 및 온도 민감성 요소 (temperature sensitive element)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다. 상기 화학물질 유도성 요소 (inducible element)는 락 오페론(lac operon), 아라비노오스 오페론 (arabinose operon)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [47] 본 발명에 따른 코리네박테리움 속 미생물은 내재적 디-프락토오스를 디-프락토오스 1-포스페이트로 전환하면서 균체 내로 수송하는 PTS 수송 시스템인 ptsF(EII<sup>fru</sup>, fruA, NCgl1861, GI:19553141, EC 2.7.1.69)와 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자를 결손 또는 불활성화한 것일 수 있고, 바람직하게는 동일 유전자를 결손 또는 불활성화시킨 것일 수 있다.
- [48] 사이코스는 D-프락토오스(D-fructose)로부터 생성되므로, 상기 유전자를 결손 또는 불활성화시키면 프락토오스의 인산화를 억제할 수 있으므로, 사이코스의 생성 효율을 현저히 개선할 수 있다.
- [49] 상기 ptsF 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다.
- [50] 서열번호 2의 아미노산 서열은 MNSVNNSSLV RLDVDFGDST TDVINNLATV IFDAGRASSA DALAKDALDR EAKSGTGVPQ QVAIPHCRSE AVSVPTLGFA RLSKGVDFSG PDGDANLVFL IAAPAGGGKE HLKILSKLAR SLVKKDFIKA LQEATTEQEI VDVVDAVLNP APKTTEPAAA PAAAAVAESG AASTSVTRIV AITACPTGIA HTYMAADSLT QNAEGRDDVE LVVETQGSSA VTPVDPKIIIE AADAVIFATD VGVKDRERFA GKPVIESGVK RAINEPAKMI DEAIAASKNP NARKVSGSGV AASAETTGEK LGWGKRIQQA VMTGVSYMVP FVAAGLLLLA LGFAFGGYDM ANGWQAIATQ FSLTNLPGNT VDVDGVAMTF ERSGLFLYFG AVLFATGQAA MGFIVAALSG YTAYALAGRP GIAPGFVGGG ISVTIGAGFI GGLVTGILAG LIALWIGSWK VPRVVQSLMP VVIIPLLTSS VVGLVMYLLL GRPLASIMTG LQDWLSSMSG SSAILLGIIL GLMMCFDLGG PVNKAAYLFG TAGLSTGDQA SMEIMAAIMA AGMVPPIALS IATLLRKKLF TPAEQENGKS SWLLGLAFVS EGAIPFAAAD PFRVIPAMMA GGATTGAISM ALGVGSRAPH GGIFVVWAIE PWWGWLIALA AGTIVSTIVV IALKQFWPNK AVAAEVAKQE AQQAAVNA이다.
- [51] 또한, 본 발명에 따른 코리네박테리움 속 미생물은 만니톨 2-디하이드로게나아제(mannitol 2-dehydrogenase)를 코딩하는 mtID (NCgl0108,

GI:19551360, EC 1.1.1.67)와 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자를 결손 또는 불활성화한 것일 수 있고, 바람직하게는 동일 유전자를 결손 또는 불활성화시킨 것일 수 있다.

[52] 프락토오스는 만니톨 2-디하이드로게나아제에 의해 D-만니톨(D-mannitol)로 전환되므로, 상기 유전자를 결손 또는 불활성화 시키면 프락토오스의 감소를 억제할 수 있으므로, 사이코스의 생성 효율을 현저히 개선할 수 있다.

[53] 상기 mtlD 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다.

[54] 서열번호 3의 아미노산 서열은 MNTPLQLNTE NLQEIASTSG VQIPAFNRAD VAPGIVHFGV GGFHRAHQAM YLNELMNEGK ALDWGIIGMG VMPDVRMRD ALASQDHLTYT LTTKAPDGTL DQKIIGSIID YVFAPEDPAR AVATLAQDSI RIVSLTVTEG GYNIDPATED FDHTNPRIVA DREALQAGDT STLQTTFFGLI TAALISRKES GSTPFTIMSC DNIQNGDLA KRFFLAFAHS VSSELGEWVE NNVAFPNSMV DRITPETTDG DRDDIKEIGY IDAWPVVSED FTQWVLEDAF TQGRPAYEEV GVQVVSDVEP YELMKLRLLN ASHQGLCYFG HLAGHHMVHD VMADTRFQDF LLAYMEREAT PTLKELPGVD LDAYRRQLIA RFGNAAVKDT VPRLCAESSD RIPKWLLPVV RENLAAGRDV TLSAAIVASW ARYAEGTDEQ GNPIKIVDRL SERVQENASG NRTDILSFIR DRGIFGDLVD AEPFTKAYSE TLSSLHDRGA EATIDALLTQ VTV이다.

[55] 용어 "결손" 또는 "불활성화"란 상기 유전자의 발현이 감소되거나 발현이 이루어지지 않는 것을 의미한다. 상기 "불활성화"는 당업계에 알려진 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예를 들면, 상동 재조합 (homologous recombination)에 의하여 불활성화된 것일 수 있다. 상기 상동 재조합은 예를 들면, 전이인자 돌연변이 (transposon mutagenesis) 또는 P1 형질도입 (P1 transduction)에 의하여 매개된 것일 수 있다.

[56] 미생물은 그 자체가 효소 담체 또는 효소를 담은 용기로서 효소 고정화와 같은 장점을 얻을 수 있다. 미생물의 경우는 원심분리를 통하여 미생물만을 회수하여 재사용이 가능하지만 효소의 경우는 그렇지 못하다. 그리고 효소는 활성을 장기간 유지시킬 수 있는 환경을 조성하기 위해 담체에 고정화시키는 부차적인 과정이 필요하지만 미생물의 경우는 그 자체가 담체의 역할을 충분히 함으로써 효소의 활성이 급격히 저하되는 것을 막아 재사용이 가능하도록 한다.

[57] 따라서, 본 발명은 종래의 효소 등을 이용한 사이코스의 생산 방법에 비해 현저히 개선된 효과를 나타낸다.

[58] 또한, 본 발명은 사이코스의 생산 방법을 제공한다.

[59] 본 발명의 사이코스의 생산 방법의 일 구현예를 그 단계별로 보다 상세히 설명한다.

[60] 먼저, 상기 미생물을 과당을 포함하는 배지에서 배양한다.

[61] 상기 미생물의 배양 조건은 특별히 한정되지 않고, 당 분야에 공지된 코리네박테리움 속의 형질전환체의 배양에 사용되는 조건이 사용될 수 있다.

- 예를 들면, 배양 온도가 26 내지 38°C일 수 있다.
- [62] 상기 배지는 2YT 배지, LB 배지, TB 배지 등의 효모추출물과 질소원을 포함하는 영양배지일 수 있다.
- [63] 또한, 포도당, 글리세롤 등을 포함하는 탄소원; 암모니아, 우레아(urea) 등을 포함하는 질소원; 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 망간 등의 필수 금속이온; 비타민 등을 포함하는 당 분야에서 통상적으로 사용되는 구명배지(defined 배지)일 수 있다.
- [64] 배지에 포함되는 과당 농도는 특별히 한정되지 않으며, 예를 들면 1%(w/v) 내지 80%(w/v)의 농도로 포함될 수 있고, 바람직하게는 1%(w/v) 내지 50%(w/v)일 수 있다.
- [65] 상기 배양은 연속, 반연속, 또는 배치 (batch) 형식 배양일 수 있다.
- [66] 상기 배양은 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 물질을 더 첨가하여 수행될 수 있다.
- [67] 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하는 물질은 특별히 한정되지 않으며, 당 분야에서 통상적으로 사용되는 물질일 수 있다.
- [68] 이후에, 상기 미생물의 배양물로부터 사이코스를 회수한다.
- [69] 사이코스를 회수하는 방법은 특별히 한정되지 않고 당 분야에 공지된 방법에 의할 수 있으며, 예를 들면 원심분리, 여과, 결정화, 이온교환 크로마토그래피 등의 방법을 들 수 있다.
- [70] 구체적으로, 배양물을 원심분리하여 배양액을 미생물로부터 분리하고, 상기 회수 방법에 의하여 사이코스를 배양액으로부터 분리함으로써 수행될 수 있다.
- [71] 본 발명의 사이코스의 생산 방법은 상기 미생물을 과당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계 이전에, 상기 미생물을 과당을 포함하지 않은 배지에서 배양하여 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및 상기 미생물의 배양물로부터 미생물을 회수하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [72] 상기 과당을 포함하지 않은 배지는, 과당을 포함하지 않은 것을 제외하고는 상기 과당을 포함한 배지와 동일한 범주의 배지일 수 있다.
- [73] 상기 미생물의 배양물로부터 미생물을 회수하는 방법은 특별히 한정되지 않고 당 분야에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들면 원심분리, 여과 등을 들 수 있다.
- [74] 상기 방법으로 회수된 미생물은 원하는 농도, 예를 들면, 고농도로 농축된 상태로 사용될 수 있다. 예를 들면, 상기 코리네박테리움 글루타미쿰의 형질전환체는 고농도로 상기 과당을 포함하는 배지 중에 접종되어 배양될 수 있다. 따라서, 과당을 포함하는 배지 중에서 배양하는 단계에서 사용되는 미생물은 상기 회수된 미생물일 수 있다.
- [75] 상기 회수된 미생물은 과당을 포함하는 배지에서 균체의 탁도(600nm

흡광도에서의 측정치, 이하 OD<sub>600</sub>)가 0.01 내지 300, 예를 들면 1 내지 300, 10 내지 300, 20 내지 300, 5 내지 300, 또는 40 내지 300이 되도록 하는 농도로 접종될 수 있다. 이렇게 고농도의 상기 효소를 포함하는 균체를 사용함으로써, 배지 중에서 고농도로 과당이 포함된 배지에서 효율적으로 과당을 사이코스로 전환할 수 있다.

[76] 상기 방법에 있어서, 상기 회수된 균체가 사용되는 경우, 상기 과당은 예를 들면 1%(w/v) 내지 80%(w/v)의 농도로 배지 중에 포함될 수 있다. 상기 범위 내에서 예컨대, 1%(w/v) 내지 35%(w/v), 10%(w/v) 내지 80%(w/v), 20%(w/v) 내지 80%(w/v), 30%(w/v) 내지 80%(w/v), 30%(w/v) 내지 80%(w/v) 등 일 수 있다.

[77] 본 발명의 사이코스의 생산 방법은 미생물의 배양물로부터 미생물을 회수하여, 분리된 미생물을 다시 과당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[78] 분리된 미생물은 2 내지 10회, 바람직하게는 3회 내지 10회, 더욱 바람직하게는 4 내지 10회 사이코스의 생산에 사용될 수 있다. 상기 분리된 미생물은 상기 배지에서 예를 들면 OD<sub>600</sub>이 5 내지 150이 되도록 하는 농도로 접종될 수 있다. 상기 범위 내에서 예컨대, 5 내지 150, 10 내지 150, 20 내지 150, 10 내지 100, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 40, 40 내지 100 등일 수 있다.

[79] 이렇게 고농도의 상기 효소를 포함하는 미생물을 사용함으로써 고농도의 과당에서 미생물의 생육 저해를 억제할 수 있으므로, 배지 중에서 고농도로 과당이 포함된 배지에서 효율적으로 과당을 사이코스로 전환할 수 있다.

[80] 상기 분리된 코리네박테리움 글루타미쿰 균체가 사용되는 경우, 상기 과당은 1%(w/v) 내지 80%(w/v), 1%(w/v) 내지 35%(w/v), 10%(w/v) 내지 80%(w/v), 20%(w/v) 내지 80%(w/v), 또는 30%(w/v) 내지 80%(w/v) 또는 30%(w/v) 내지 50%(w/v)의 농도로 배지 중에 포함될 수 있다.

[81]

[82] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[83]

[84] **실시예 1. 코리네박테리움 형질전환체의 제조**

[85] 대장균-코리네박테이룸 셔틀벡터인 pCES208 (J. Microbiol. Biotechnol., 18:639-647, 2008)를 변형하여 종결자(terminator)와 lac 프로모터가 삽입된 pSGT208 셔틀벡터를 제작하여 사용하였다.

[86] 코리네박테리움 글루타미쿰에서 사이코스를 생산하기 위하여 사이코스 3-에피머라제는 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens str. C58; taxid:176299; GenBank NID: NC\_003062, ATCC33970)의 dpe 유전자(AGR\_L\_260, GI:15890243)를 상기 제작한 pSGT208 셔틀벡터에 도입하여 사용하였다.

[87] 상세히 설명하면 프라이머 1과 2를 이용하여 아그로박테리움 투메파시엔스

계놈으로부터 dpe 유전자를 증폭하고, 이를 제한효소 KpnI와 BamHI로 절단하여 pSGT208 서플렉터의 동일 부위로 삽입하여 사이코스 3-에피머라제를 포함하는 pS208-dpe 재조합 서플렉터를 제작하였다.

[88] 이후에, 코리네박테리움 글루타미쿰에서 사이코스 3-에피머라제의 발현량을 증대시키기 위하여 pS208-dpe에서 lac 프로모터를 pTrc99a에서 유래한 trc 프로모터로 교체하였으며, 이를 pS208cT-dpe로 명명하였다.

[89] 상기 제작한 사이코스 3-에피머라제를 포함하는 재조합 벡터 pS208-dpe, pS208cT-dpe와 이에 대한 음성 대조군인 pSGT208 벡터를 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032에 도입하여 형질전환시키고, 이를 과당으로부터 사이코스 생산에 이용하였다. 형질전환법은 Handbook of Corynebacterium glutamicum (Lothar Eggeling 등, ISBN 0-8493-1821-1, 2005 by CRC press)에 명시된 방법을 따랐다.

[90] 사용된 프라이머는 하기 표 1에 기재하였다.

[91] 표 1

[Table 1]

서열번호	프라이머	염기서열 (5'-3')
4	프라이머 1	GCAGGTACCAGGAGGTAATAAAATATGAAACACGGCATCTATATTTCTTACTGG
5	프라이머 2	GCTGGATCCTTAGCCACCAAGAACGAAGCGGG

[92]

[93] 실시예 2. 코리네박테리움 글루타미쿰의 형질전환체를 이용한 과당으로부터 사이코스의 생산

[94]

[95] 고농도의 과당을 첨가할 때 균체 생육 저해의 문제를 해결하기 위해 별도로 배양한 고농도의 균체를 첨가할 수 있다면 고농도의 사이코스 생산이 가능하다.

[96] 고농도의 균체를 확보하기 위해 상기 실시예 1에서 제조된 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체를 20 $\mu$ g/ml의 카나마이신을 포함하는 5 ml의 LB 배지(Difco)에 접종하여 30°C, 250rpm 조건으로 중배양한 후, 5g/L 포도당 및 20 $\mu$ g/ml의 카나마이신이 있는 최소 배지(1리터 당 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 50mg NaCl, 2 g urea, 0.1 mg biotin, 0.1 mg thiamine)에 접종하여 본배양 하였다.

[97] 본배양은 흡이 파인 300 ml 삼각플라스크에 50ml 부피로 30°C, 180 rpm 조건에서 36 시간 배양하여 충분한 균체량과 단백질의 충분한 발현을 유도하였다.

[98] 얻어진 상기 배양액을 원심분리하여 상층액을 제거하고 균체를 회수하여, 기질인 40%(w/v) 과당을 함유하는 상기와 동일한 최소배지에 균체농도를 65 OD<sub>600</sub>로 재현탁한 뒤, 30°C, 180rpm 조건에서 배양하였다.

[99] 과당 및 사이코스의 농도는 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 측정하였다. HPLC는 SCL-10A(Shimadzu, 일본)를 사용하였으며, Kromasil 5NH<sub>2</sub>

칼럼(4.6 mm X 250 mm), 이동상은 75% 아세토니트릴을 이용하여 1.5 mL/분으로 흘리면서 40°C에서 분리한 후 RI(Reflective Index) 검출기를 이용하여 분석하였다. 상기의 조건에서 과당의 머무름시간(retention time)은 5.5분, 사이코스는 4.6분이었다.

[100] 측정 결과는 도 1에 나타내었다. 회색막대는 24시간의 사이코스 생산 결과이며, 진회색막대는 48시간의 사이코스 생산 결과이다.

[101]

[102] 도 1을 참조하면, 음성 대조군으로 pSGT208 셔틀벡터만을 도입한 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032의 경우 사이코스가 전혀 검출되지 않아 해당 코리네박테리움 글루타미쿰은 내재적으로 과당으로부터 사이코스를 생산하는 경로를 지니지 않은 것으로 보인다.

[103] pS208-dpe 재조합 셔틀벡터를 사용한 실험군의 경우, 24시간에 약 7.4g/L의 사이코스를 생산하여 사이코스 3-에피머라제가 유의적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체에서 발현된 것을 확인할 수 있었으며, 이때 48시간에 약 8.7 g/L가 생산되어 24시간에 생산이 거의 종료된 것을 확인하였다.

[104] pS208cT-dpe 재조합 셔틀벡터를 사용한 실험군의 경우, 사이코스 생산량은 크게 증가되어 24시간에 약 51.5 g/L, 48시간에 약 61.2 g/L로 나타났으며, 이는 사이코스 3-에피머라제가 코리네박테리움 글루타미쿰 내에서 높은 활성을 나타내고 있으며, 과당으로부터 사이코스의 전환율은 발현량에 의존적임을 나타내는 결과로 볼 수 있다.

[105]

[106] 실시에 3: 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환 균체의 반응 후 회수를 통한 과당으로부터 사이코스의 연속생산

[107]

[108] 상기 실시예 2의 결과로 보건데, 사이코스 3-에피머라제는 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체 내에서 24시간에 최대치의 활성을 나타낸 후 이후 크게 증가하지 않은 것을 알 수 있다.

[109] 이러한 결과를 토대로, 24시간 후에 사이코스 3-에피머라제가 과당을 사이코스로 전환하는 활성이 얼마나 오래 유지되는지 확인하기 위하여, 과당의 존재 하에서 24시간 동안 균체를 배양하고, 배양물로부터 균체를 분리하여, 다시 과당의 존재하에서 24시간 동안 균체를 배양하는 과정을 4회 반복하였다.

[110] 배양 조건 및 분석 방법은 실시예 2와 동일하게 수행하였다.

[111] 측정 결과는 도 2에 나타내었다. 패널 A는 사이코스 생산량을 나타낸 결과이며, 패널 B는 균체의 농도를 나타낸 결과이며, 패널 C는 사이코스 생산량을 균체 농도의 값으로 나누어 표현한 결과이다.

[112]

[113] 도 2를 참조하면, 균체 농도(도 2의 패널 B)는 반응수의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였는데, 이는 균체 반응액을 원심분리하여 반응 상층액과 균체를

분리하는 과정에서 발생하는 균체의 손실 때문으로 판단된다.

- [114] 사이코스의 전환수준은 4회 반복하는 동안 약 50-60 g/L로서 큰 차이가 나지 않은 것으로 나타났으며(도 2의 패널 A), 이로서 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 형질전환체의 균체 및 균체내에서 발현된 사이코스 3-에피머라제의 활성이 수회 반복하여도 안정한 것으로 볼 수 있다. 이러한 결과는 도 2의 패널 C에서 균체 농도에 대한 사이코스 생산 수준이 줄어들지 않은 것으로 더욱 구체적으로 확인할 수 있다.

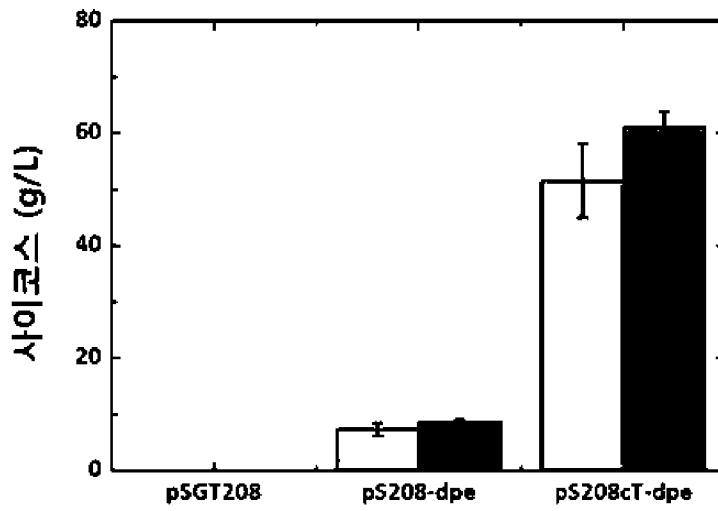
- [115]

## 청구범위

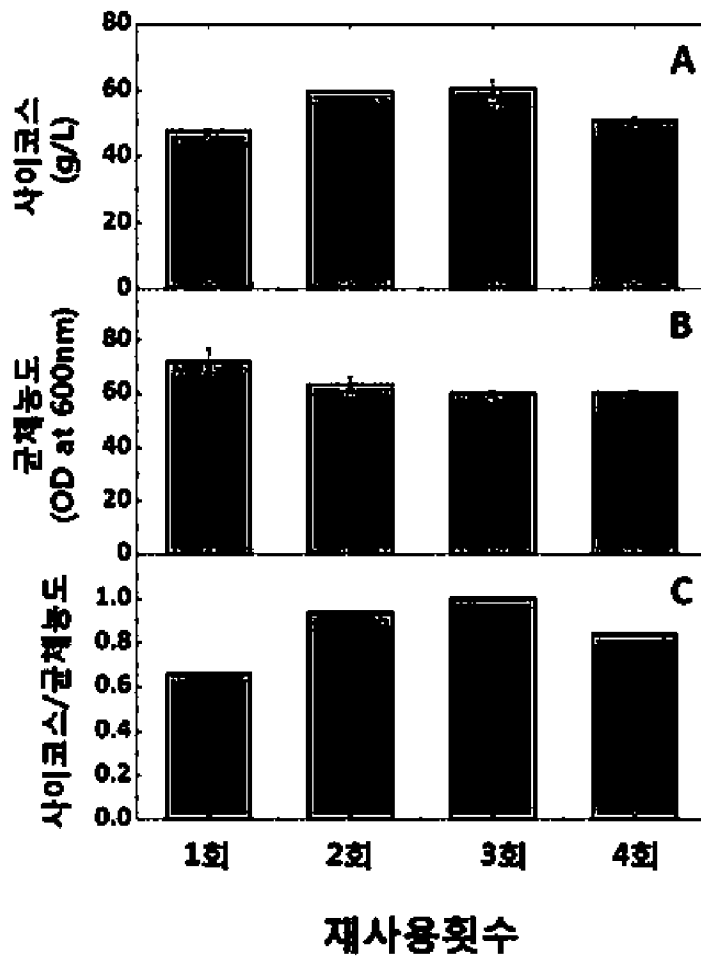
- [청구항 1] 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 코리네박테리움속 미생물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 것인 미생물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC13032에 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 것인 미생물.
- [청구항 4] 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 미생물 내에 그 자체로 또는 벡터를 이용하여 도입되는, 미생물.
- [청구항 5] 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자 및 서열번호 3의 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 유전자 중 적어도 하나를 결손 또는 불활성화시킨, 미생물.
- [청구항 6] 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 ptsF 및 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 mtlD 중 적어도 하나를 결손 또는 불활성화시킨, 미생물.
- [청구항 7] 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 미생물을 과당을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 미생물의 배양물로부터 사이코스를 회수하는 단계를 포함하는 사이코스의 생산 방법.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 과당은 1%(w/v) 내지 80%(w/v)의 농도인, 방법.
- [청구항 9] 청구항 7에 있어서, 상기 배지는 영양배지 또는 구멍배지인, 방법.
- [청구항 10] 청구항 7에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계 이전에 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 미생물을 과당을 포함하지 않는 배지에서 배양하여 과당의 사이코스로의 전환을 촉매하는 활성을 가진 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계; 및 상기 미생물의 배양물로부터 미생물을 회수하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 회수한 미생물을 과당을 포함하는 배지에 OD<sub>600</sub>이 0.01 내지 300이 되도록 하는 농도로 접종하여 배양하는, 방법.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서, 과당을 포함하는 배지의 과당 농도는 1%(w/v) 내지 80%(w/v)인, 방법.
- [청구항 13] 청구항 7에 있어서, 상기 미생물의 배양물로부터 미생물을 회수하여, 분리된 미생물을 다시 과당을 포함하는 배지에서

- 배양하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [청구항 14] 청구항 13에 있어서, 상기 분리된 미생물을 과당을 포함하는 배지에  $OD_{600}$ 이 5 내지 150이 되도록 하는 농도로 접종하여 배양하는, 방법.
- [청구항 15] 청구항 13에 있어서, 과당을 포함하는 배지의 과당 농도는 10 % (w/v) 내지 80 % (w/v)인, 방법.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/009641

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 1/21(2006.01)i, C12N 15/61(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/77(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 1/21; C12N 9/90; C07H 21/04; C12P 19/20; C12P 13/08; C12N 15/61; C12N 15/63; C12N 15/77

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) &amp; Keywords: D-psicose, Corynebacterium glutamicum, ptsF, D-psicose epimerase

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0041910 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 22 April 2011 See claims 1-12; paragraph 17.	1-15
Y	KR 10-2011-0035805 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 06 April 2011 See paragraphs 70-71.	1-15
Y	US 2009-0081740 A1 (BINDER, Thomas P. et al.) 26 March 2009 See claim 12.	5-6
A	MOON, MIN-WOO et al., "Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in Corynebacterium glutamicum ATCC 13032", FEMS Microbiology Letters, 15 March 2005, vol. 244, no. 2, pp. 259-266 See the entire document.	1-15
A	US 7332310 B2 (NAKAGAWA, Satoshi et al.) 19 February 2008 See the entire document.	1-15
A	NCBI, Genbank accession no. NP_355915.1 (12 April 2012) See the entire document.	1-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search

24 FEBRUARY 2014 (24.02.2014)

Date of mailing of the international search report

24 FEBRUARY 2014 (24.02.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR



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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2013/009641**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0041910 A	22/04/2011	KR 10-1106253	18/01/2012
KR 10-2011-0035805 A	06/04/2011	CN 102869783 A	09/01/2013
		EP 2470668 A2	04/07/2012
		JP 2013-501519 A	17/01/2013
		US 2012-0244580 A1	27/09/2012
		WO 2011-040708 A2	07/04/2011
		WO 2011-040708 A3	07/07/2011
US 2009-0081740 A1	26/03/2009	CN 101855357 A	06/10/2010
		EP 2201126 A1	30/06/2010
		JP 2010-539941 A	24/12/2010
		US 8048649 B2	01/11/2011
		WO 2009-042878 A1	02/04/2009
US 7332310 B2	19/02/2008	EP 1108790 A2	20/06/2001
		EP 2107128 A2	07/10/2009
		JP 2002-191370 A	09/07/2002
		JP 4623825 B2	02/02/2011
		KR 10-0961398 B1	09/06/2010
		KR 10-0970106 B1	15/07/2010
		KR 10-2001-0082585 A	30/08/2001
		KR 10-2009-0077738 A	15/07/2009
		US 2002-0197605 A1	26/12/2002
		US 2006-0228712 A1	12/10/2006

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**  
C12N 1/21(2006.01)i, C12N 15/61(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/77(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)  
C12N 1/21; C12N 9/90; C07H 21/04; C12P 19/20; C12P 13/08; C12N 15/61; C12N 15/63; C12N 15/77

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: 사이코스, 코리네박테리움 글루타미쿰, ptsF, 사이코스 에피머화 효소

**C. 관련 문헌**

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0041910 A (경상대학교산학협력단) 2011.04.22. 청구항 1-12; 단락 17 참조.	1-15
Y	KR 10-2011-0035805 A (씨제이제일제당 (주)) 2011.04.06. 단락 70-71 참조.	1-15
Y	US 2009-0081740 A1 (BINDER, THOMAS P. 외 1명) 2009.03.26. 청구항 12 참조.	5-6
A	MOON, MIN-WOO 외 6명, 'Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in Corynebacterium glutamicum ATCC 13032', FEMS Microbiology Letters, 15 March 2005, Vol.244, No.2, pp.259-266 전체 문헌 참조.	1-15
A	US 7332310 B2 (NAKAGAWA, SATOSHI 외 9명) 2008.02.19. 전체 문헌 참조.	1-15
A	NCBI, Genbank accession no. NP_355915.1 (2012.04.12.) 전체 문헌 참조.	1-15

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.  대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:  
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌  
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.  
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.  
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 " & " 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌  
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2014년 02월 24일 (24.02.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 02월 24일 (24.02.2014)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------

## 제1기제란 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. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

서면

전자적 형태

b. 제출시기

출원시 국제출원에 포함

전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

조사를 위해 본 기관에 추후 제출

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

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0041910 A	2011/04/22	KR 10-1106253	2012/01/18
KR 10-2011-0035805 A	2011/04/06	CN 102869783 A	2013/01/09
		EP 2470668 A2	2012/07/04
		JP 2013-501519 A	2013/01/17
		US 2012-0244580 A1	2012/09/27
		WO 2011-040708 A2	2011/04/07
		WO 2011-040708 A3	2011/07/07
US 2009-0081740 A1	2009/03/26	CN 101855357 A	2010/10/06
		EP 2201126 A1	2010/06/30
		JP 2010-539941 A	2010/12/24
		US 8048649 B2	2011/11/01
		WO 2009-042878 A1	2009/04/02
US 7332310 B2	2008/02/19	EP 1108790 A2	2001/06/20
		EP 2107128 A2	2009/10/07
		JP 2002-191370 A	2002/07/09
		JP 4623825 B2	2011/02/02
		KR 10-0961398 B1	2010/06/09
		KR 10-0970106 B1	2010/07/15
		KR 10-2001-0082585 A	2001/08/30
		KR 10-2009-0077738 A	2009/07/15
		US 2002-0197605 A1	2002/12/26
		US 2006-0228712 A1	2006/10/12