(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 6 월 14 일 (14.06.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/105932 A1

(51) 국제특허분류:
C12P 19/12 (2006.01) *C12P 19/14* (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/013493

(22) 국제출원일: 2017 년 11 월 24 일 (24.11.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0165598 2016 년 12 월 7 일 (07.12.2016) KR

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

(72) 발명자: 김경헌 (KIM, Kyoung Heon); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초4동, 삼풍아파트), Seoul (KR). 이상현 (LEE, Sang-Hyun); 34049 대전시 유성구 엑스포로 448, 508동 1403호(전민동, 엑스포아파트), Daejeon (KR). 김동현 (KIM, Dong-Hyun); 49374 부산시 사하구 감천로105번길 40, 2동 305호(감천동, 감천아파트), Busan (KR). 윤은주 (YUN, Eun-Ju); 08640 서울시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호(시흥동, 현대빌라), Seoul (KR).

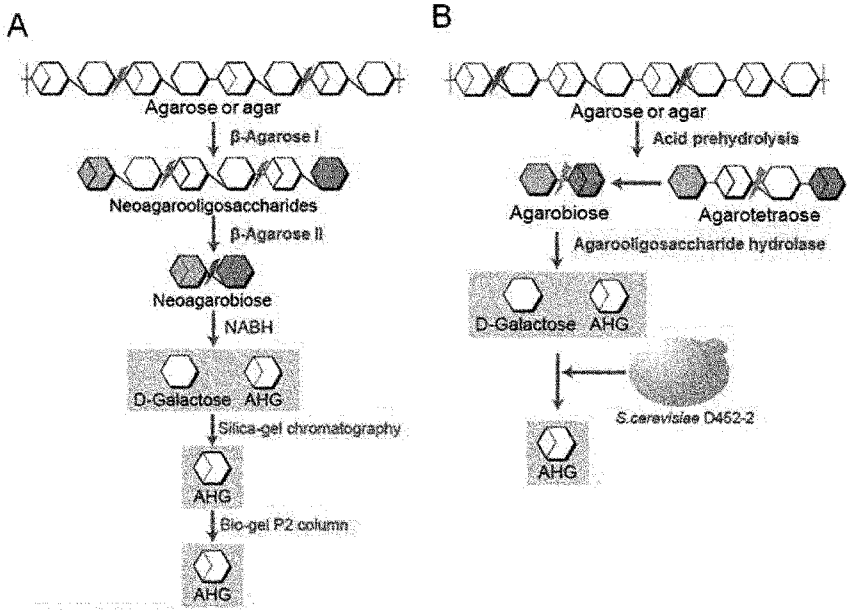
(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

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

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

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING ANHYDROUS GALACTOSE DERIVED FROM SEAWEED

(54) **발명의 명칭:** 해조류 유래 무수갈락토오스의 생산방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for producing anhydrous galactose derived from seaweed, and provides an improved production yield rate of 3,6-anhydro-L-galactose by using microorganisms during acid treatment, neutralization, and purification after enzymatic hydrolysis, of agarose or agar.

(57) **요약서:** 본 발명은 해조류 유래 무수갈락토오스의 생산방법에 관한 것으로, 아가로스 또는 아가의 산 처리, 중화 및 효소적 가수분해 후 정제과정에서 미생물을 사용함으로써 3,6-안하이드-L-갈락토오스의 생산 수율을 개선한 효과를 제공한다.

[다음 쪽 계속]

WO 2018/105932 A1

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))

명세서

발명의 명칭: 해조류 유래 무수갈락토오스의 생산방법

기술분야

[1] 본 발명은 아가로스 또는 아가의 산 처리, 중화 및 효소적 가수분해 후 정제과정에서 미생물을 사용함으로써 3,6-안하이드-L-갈락토오스의 생산 수율을 개선한 해조류 유래 무수갈락토오스의 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 홍조류를 구성하는 주요한 다당체는 아가로스이며, 아가로스는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하 'AHG'라 함)와 D-갈락토오스가 알파-1,3-결합과 베타-1,4-결합이 교차적으로 번갈아 가며 연결되어 있는 중합체이다. 이 중에서도 AHG는 화장품 미백 및 보습 기능성뿐만 아니라 항충치 기능성 및 대장암 예방 기능성을 가진 복합기능성 고부가가치 소재이다. 따라서 홍조류의 주요 탄수화물인 아가 또는 아가로스로부터 AHG를 효율적으로 생산하고 정제하는 기술은 매우 중요하다.

[3] AHG를 생산하는 방법으로, 첫째는, 강산을 이용하여 고온에서 아가로스 또는 아가를 가수분해하여 AHG를 생산하는 방법이 있다. 이 방법은 비용이 저렴하고 간단하지만 높은 온도에서 단당인 AHG와 D-갈락토오스가 5-히드록시메틸퍼퓨랄(5-HMF; 5-hydroxymethyl furfural)로 분해되어 AHG생산 수율이 저하되는 것이 단점이다. 둘째는, 효소를 이용하여 상온에서 아가로스 또는 아가를 가수분해하여 AHG를 생산하는 방법이 있다. 하지만, 이 방법은 아가로스나 아가의 낮은 용해도로 인해 고농도의 반응이 불가하여 생산되는 AHG의 농도가 매우 낮아 분리정제 비용이 증가하며 결과적으로 AHG 생산 수율이 낮다. 셋째는, 아세트산 같은 약산을 이용하여 아가로스나 아가를 아가로올리고당(AOSs)로 분해한 후 AOSs를 엑소-타입 베타-아가라아제(exo-type β-agarase II) 효소반응을 통해 네오아가로바이오스(NAB; neoagarobiose)를 생산한다. 그러나 이때 아가로트리오스(agarotriose)가 부산물로 함께 생성이 된다는 단점이 있으며 이를 분해하기 위해서는 아가로라이틱 베타-갈락토시다아제(agarolytic β-galactosidase; ABG)라는 추가적인 효소 도입이 필요하다. 이후 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소(NABH;neoagarobiose hydrolase)의 효소반응을 통해 단당류인 AHG와 D-갈락토오스를 획득할 수 있다. 그러나 이 공정의 첫 단계인 전처리 반응 시 아세트산을 사용하게 되면 이후 중화 과정에서 다량의 염이 생성된다는 문제점이 있다. 또한, 반응을 위한 효소 생산을 위해 별도로 발효를 통해 재조합 효소를 생산해야 하기 때문에 공정이 매우 복잡하고 생산 비용이 높아져 경제성이 훼손된다. 넷째로, 낮은 농도의 중성버퍼를 사용하여 고온(170℃)에서 전처리하는 방법이 있으나 대량생산 시 고온고압

반응기가 요구된다는 문제점이 있다. 또한, 전처리 공정 중에 AHG가 5-HMF로 과분해가 되어 이것이 AHG 생산수율을 떨어뜨린다는 단점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 본 발명의 목적은 강산 처리 및 중화 과정을 거쳐 아가로스 또는 아가로부터 아가로바이오스를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[5] 본 발명의 다른 목적은 강산 처리, 중화 과정 및 효소적 가수분해를 거친 아가로스 또는 아가에 대해 미생물의 혐기 및 호기적 배양을 통해 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 건조중량 기준으로 10 내지 37%(w/v)의 아가로스 또는 아가를 기질로 사용하여 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산을 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시킨 후 중화 과정을 수행하여 반응 산물 내 5-히드록시메틸퍼퓨랄(5-hydroxymethyl furfural)의 수율이 1.5%(w/w) 미만이 되는 아가로바이오스를 함유하는 반응 산물을 얻는 단계를 포함하는 아가로바이오스의 생산방법을 제공한다.

[7] 본 발명은 또한 건조중량 기준으로 10 내지 37%(w/v)의 아가로스 또는 아가를 기질로 사용하여 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산과 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시킨 후 중화 과정을 수행하여 반응 산물 내 5-히드록시메틸퍼퓨랄(5-hydroxymethyl furfural)의 수율이 1.5%(w/w) 미만이 되는 아가로바이오스를 함유하는 반응 산물을 얻는 단계;

[8] 상기 반응 산물과, 아가로바이오스를 기질로 사용하는 아가로올리고당 가수분해효소(agarooligosaccharide hydrolase)를 반응시키는 단계; 및

[9] 상기 단계에서 얻은 가수분해산물 하에서 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 배양하고, 이의 배양액에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 수득하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[10] 본 발명은 아가로스 또는 아가에 대해 강산 처리 및 중화 과정을 거쳐 고농도의 아가로바이오스를 생산할 수 있는 최적 조건을 확립하고, 아가로바이오스를 기질로 사용하는 효소 및 갈락토오스를 기질로 사용하는 미생물의 배양을 통해 기존의 정제과정을 별도로 거치지 않고 AHG를 수득하므로 AHG 손실을 줄일 수 있어 AHG를 고수율로 얻을 수 있는 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[11] 도 1은 아가로스 또는 아가로부터의 AHG 생산 및 정제 공정 모식도를 도시한 것으로, (A)는 종래의 효소당화를 통한 AHG 생산 및 미생물을 이용한 AHG 정제 공정도이고, (B)는 본 발명의 AHG 생산 공정도이다.

[12] 도 2는 본 발명의 AHG 생산 공정도에 따라 아가로스에 0.5%(w/v) 강산을

처리하여 140℃에서 10분 동안 산 가수분해한 후 액화정도(A)를 나타낸 그래프와 반응물의 TLC 분석 결과(B)를 나타낸 것이다.

[13] 도 3a는 본 발명의 AHG 생산 공정도에 따라 아가로스에 0.5%, 1% 및 2%(w/v) 인산을 처리하여 110℃에서 10분 동안 산 가수분해한 후 얻은 반응물의 TLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

[14] 도 3b는 본 발명의 AHG 생산 공정도에 따라 아가로스에 2%(w/v) 인산을 처리하여 110℃에서 10분 동안 산 가수분해한 후 얻은 반응물의 GC-TOF/MS 분석 결과를 나타낸 것이다.

[15] 도 4a는 재조합 아가로올리고당 가수분해효소의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.

[16] 도 4b는 산 처리 및 중화 과정을 거친 아가 및 아가로스를 상기 아가로올리고당 가수분해효소와 반응시킨 반응물의 TLC 사진도를 나타낸 것이다.

[17] 도 4c는 산 처리 및 중화 과정을 거친 아가 및 아가로스를 상기 아가로올리고당 가수분해효소와 반응시킨 반응물의 GC-TOF/MS 분석 결과를 나타낸 것이다.

[18] 도 5는 본 발명의 AHG 생산 공정도에 따라 아가 또는 아가에 대해 GRAS 미생물인 효모를 이용하여 AHG를 정제한 결과를 효모 배양 시간별로 확인한 TLC 사진도를 나타낸 것이다.

[19] 도 6은 본 발명의 AHG 생산 공정도에 따라 아가 20%(w/w)에 대하여 인산 1%, 2% 및 3%(w/v) 농도로 90℃에서 산 가수분해한 후 시간별 당화율을 나타낸 것이다.

[20] 도 7a는 본 발명의 AHG 생산 공정도에 따라 아가에 1%(w/v) 인산을 처리하여 90℃에서 480분 동안 산 가수분해한 후 얻은 반응물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

[21] 도 7b는 본 발명의 AHG 생산 공정도에 따라 아가에 2%(w/v) 인산을 처리하여 90℃에서 480분 동안 산 가수분해한 후 얻은 반응물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

[22] 도 7c는 본 발명의 AHG 생산 공정도에 따라 아가에 3%(w/v) 인산을 처리하여 90℃에서 480분 동안 산 가수분해한 후 얻은 반응물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[23] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[24] 본 발명은 건조중량 기준으로 10 내지 37%(w/v)의 아가로스 또는 아가를 기질로 사용하여 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산을 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시킨 후 중화 과정을 수행하여 반응 산물 내 5-히드록시메틸퍼퓨랄(5-hydroxymethyl furfural)의 수율이 1.5%(w/w) 미만이 되는 아가로바이오스를 함유하는 반응 산물을 얻는 단계를 포함하는 아가로바이오스의 생산방법에 관한 것이다.

[25] 또한, 본 발명은 건조중량 기준으로 10 내지 37%(w/v)의 아가로스 또는 아가를 기질로 사용하여 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 인산과 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시킨 후 중화 과정을 수행하여 반응 산물 내 5-히드록시메틸퍼퓨랄(5-hydroxymethyl furfural)의 수율이 1.5%(w/w) 미만이 되는 아가로바이오스를 함유하는 반응 산물을 얻는 단계;

[26] 상기 반응 산물과, 아가로바이오스를 기질로 사용하는 아가로올리고당 가수분해효소(agarooligosaccharide hydrolase)를 반응시키는 단계; 및

[27] 상기 단계에서 얻은 가수분해산물 하에서 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 배양하고, 이의 배양액에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 수득하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법을 제공한다.

[28] 본 발명자들은 종래에 알려진 AHG 생산방법에서 발견되는 문제점을 해결하고자, 첫째, AHG 생산 시 강산을 사용하되 5-HMF가 최소로 생산되는 조건을 확립하여 고농도로 아가로스 또는 아가 전처리 반응을 수행해 높은 농도와 높은 수율로 아가로올리고당, 특히 아가로바이오스를 고수율로 획득하였다(도 1 참조). 둘째, 수득한 고농도 고수율의 아가로바이오스 및 아가로올리고당은 강염기로 중화하고, 이때 중화되어 생성된 염(예를 들어, 인산염)은 제거하지 않고 다음 단계인 아가로올리고당 가수분해효소 반응의 완충용액으로 이용된다. 셋째, 아가로바이오스를 효율적으로 분해하는 아가로올리고당 가수분해효소를 이용하여 고농도로 AHG와 D-갈락토오스를 생산한다. 넷째, AHG 정제 시 인체에 무해한 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물인 효모를 사용한다. 혐기 또는 호기적 조건에서 효모 배양 시 탄소원으로 효소반응 산물인 AHG와 D-갈락토오스를 공급해주며 이 중에서 갈락토오스만을 선택적으로 대사하게 함으로써 AHG를 정제할 수 있다(도 1B 참조). 이 정제방법은 인체에 유해한 유기용매를 사용하지 않으며, 정제과정 중에 손실되는 AHG 양이 거의 없으므로 정제된 AHG를 고수율로 획득할 수 있다는 장점이 있다.

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

[30] 상기 아가로스 또는 아가에 대한 강산 처리는 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산과 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시키는 것일 수 있다. 더 구체적으로, 아가로스를 기질로 사용하여 0.5 내지 2%(w/v) 농도의 강산과 100 내지 140℃에서 5분 내지 20분 동안 반응시키는 것일 수 있다. 더 구체적으로, 아가를 기질로 사용하여 1 내지 3%(w/v) 농도의 강산과 80 내지 100℃에서 60분 내지 480분 동안 반응시키는 것일 수 있다.

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

수 있다.

[32] 상기 아가로스 또는 아가에 대한 강산 처리 후 고농도의 아가로바이오스를 함유하는 아가로올리고당이 생산될 수 있다.

[33] 강산 처리에 사용되는 상기 아가로스 또는 아가의 함량은 건조중량 기준으로 10 내지 37%(w/v), 더 구체적으로 15 내지 31%(w/v), 보다 구체적으로 16.8 내지 30.7%(w/w)으로 사용될 수 있다. 상기 범위 내일 경우 90%, 95%, 또는 98% 이상의 액화율을 나타낼 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우 기질의 분해율이 현저히 저하될 수 있다.

[34] 상기에서 강산 처리된 아가로스 또는 아가에 대해 강염기를 부가하여 pH 5 내지 7이 되도록 중화한다.

[35] 상기 강염기로, NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$ 또는 $Ba(OH)_2$ 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다.

[36] 상기 아가로올리고당 가수분해효소는 기질로 아가로바이오스를 사용하여 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해하는 효소로, SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[37] 상기 아가로올리고당 가수분해효소는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로바이오스의 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.

[38] 상기 아가로올리고당 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus* degradans) 2-40^{T}에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[39] 상기 아가로올리고당 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus* degradans) 2-40^T 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus* degradans) 2-40^T 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다. 재조합 기술을 이용하는 경우, 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.

[40] 상기 아가로바이오스와 아가로올리고당 가수분해효소의 반응은 20 내지

40℃의 온도 범위에서 100 내지 300 rpm 조건으로 5시간 내지 48시간 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 30 내지 40℃의 온도 범위에서 10시간 내지 24시간 동안 실시할 수 있다.

[41] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[42] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc.Natl* Acad. Sci USA 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR 25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

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

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

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

[46] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법에 있어서, 상기

아가로바이오스를 기질로 사용하는 아가로올리고당 가수분해효소에 의해 아가로바이오스는 D-갈락토오스와 AHG로 가수분해되고, 여기에 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 혐기 또는 호기 조건에서 배양하는 경우 미생물 배양액에는 갈락토오스가 소비되고, AHG만 남아있게 된다. 따라서, 갈락토오스와 AHG를 포함하는 가수분해산물로부터 AHG를 별도로 정제하는 추가 과정을 거칠 필요가 없는 것이다.

[47] 상기 갈락토오스 대사능이 있는 미생물은 락토바실러스 카제이(*L.* casei) 락토바실러스 애시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*L.* bulgaricus), 비피도박테리움 롱굼(*B.* longum), 비피도박테리움 비피둠(*B.* bifidum), 액티레귤라리스(*Actiregularis*) 등의 락토바실러스 및 비피도박테리움을 포함하는 유산균; 바실러스; 스트렙토마이세스; 코리네박테리움; 자이모모나스 모빌리스(*Z.* mobilis) 등의 자이모모나스; 대장균; 또는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces* cerevisiae), 피키아 파스토리스(*P.* pastoris) 등의 효모 중 어느 하나일 수 있다. 이들은 앞서 언급한 인체에 무해한 GRAS 미생물로, 갈락토오스를 대사하므로 미생물 배양액에는 미생물과 AHG만 남게 된다.

[48] 따라서, 기존의 정제과정 없이 상기의 미생물 배양액을 원심분리 또는 여과 등을 통해 미생물 또는 세포 찌꺼기들을 제거하고 남은 액체 내에는 AHG가 남게 되어 고수율로 AHG를 얻을 수 있다.

[49] 상기 갈락토오스 대사능이 있는 미생물은 호기 또는 혐기 조건에서 배양될 수 있다. 보다 바람직하게는, 혐기 조건에서 배양될 수 있으며, 혐기적 배양 조건, 예를 들어, 배양 배지, 배양 온도, 시간 등은 당업자의 이해 범주 내에서 수행될 수 있어 특별히 제한하지는 않는다.

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

발명의 실시를 위한 형태

[51] <실시예 1> 산 가수분해 조건 확립

[52] 강산을 이용하여 아가로스 또는 아가를 가수분해할 경우 AHG 또는 D-갈락토오스가 과분해 되어 5-HMF로 전환된다. 따라서 강산인 인산을 희석한 묽은 인산을 사용하여 마이크로웨이브 다이제스트 시스템(microwave digestion system)에서 산 가수분해를 수행하였다.

[53] 묽은 인산의 가수분해 효과를 알아보기 위해, 먼저, 기질 투입량 최적화를 실시하였다. 16.8, 23.8, 30.7 및 36.8%(w/v)에 해당하는 아가로스 기질을 0.5%(w/v) 인산을 이용하여 140℃, 10분 동안 산 가수분해시켰다. 이때, 사용한 아가로스는 건조중량 기준이다. 액화정도(liquefaction)는 처음 투입된 아가로스 무게(g)에서 산 가수분해 후, 12,000×g, 4℃, 30분간 원심 분리한 침천물을 105℃, 12시간 건조시킨 양(g)을 뺀 다음, 처음 투입된 아가로스로 나눈 백분율로 나타냈다.

[54] 그 결과, 도 2A와 같이 16.8-30.7% 기질 투입 시 98% 이상 액화되었지만, 36.8% 기질 투입 조건에서는 액화 정도가 5%로 현저하게 감소하였다. 이는 TLC를 측정한 도 2B에서 볼 수 있듯이 36.8% 기질 투입 조건에서는 아가로스가 제대로 분해되지 않았다. 공정에서 고농도의 기질을 투입하는 것은 최종 산물인 AHG를 최대한 고농도로 생산할 수 있기 때문에 매우 중요하다. 또한, 물, 에너지 및 반응기 크기를 줄일 수 있어 공정비용을 줄일 수 있다. 따라서 가장 높은 기질 투입량인 30.7%을 선정하여 추후 산 가수분해 조건을 확립하였다.

[55] 산 가수분해로 효과적인 아가로올리고당, 특히 아가로바이오스를 생산하기 위해, 0.5, 1, 2%(w/v) 인산에 대하여 110, 120, 130, 140℃의 반응온도에서 각각 5분 또는 10분간 가수분해시켰다.

[56] 표 1은 가수분해 조건에 따른 액화도, 아가로바이오스 및 5-HMF 생성량을 확인한 결과이다.

[57] [표1]

산 전처리 조건		액화정도 (%, w/w)	아가로바이오스 수율 (%, w/w)	5-HMF 수율 (%, w/w)
인산 0.5% (w/v)	120℃, 10분	18.5±6.3	4.0±0.1	0.0±0.0
	130℃, 5분	91.1±7.0	19.5±5.2	0.2±0.1
	130℃, 10분	99.3±0.1	44.7±0.9	0.9±0.0
	140℃, 5분	99.0±1.3	21.8±5.1	0.2±0.1
	140℃, 10분	99.2±0.1	57.2±0.2	4.2±0.3
인산 1% (w/v)	110℃, 5분	64.4±9.7	10.5±1.7	0.0±0.0
	110℃, 10분	99.4±0.2	39.0±1.4	0.2±0.0
	120℃, 5분	93.8±0.7	24.3±5.1	0.1±0.0
	120℃, 10분	99.7±0.2	59.1±3.7	0.5±0.1
	130℃, 5분	99.9±0.4	66.1±1.1	1.2±0.3
	130℃, 10분	99.2±0.1	49.3±10.4	7.3±3.3
	140℃, 5분	99.4±0.1	62.5±1.1	2.9±0.6
	140℃, 10분	98.4±0.2	32.4±0.8	11.1±2.2
인산 2% (w/v)	110℃, 5분	99.6±0.2	47.2±7.1	0.2±0.1
	110℃, 10분	99.4±0.3	70.0±1.2	1.3±0.6
	120℃, 5분	99.3±0.1	67.0±2.6	0.8±0.4
	120℃, 10분	99.3±0.1	64.4±3.9	2.5±1.3
	130℃, 5분	99.3±0.2	65.4±2.1	2.1±0.5
	130℃, 10분	99.2±0.2	44.6±6.8	9.0±2.3
	140℃, 5분	99.5±0.1	53.1±6.9	5.7±1.4
	140℃, 10분	98.9±0.1	25.2±3.0	16.9±1.9

[58] 표 1에 나타난 바와 같이, 0.5% 인산 조건에서 120℃, 10분 및 130℃, 5분 반응 조건과 1% 인산 조건에서 110℃, 5분 및 120℃, 5분 반응 조건에서 용해도가 18.5

- 93.8%으로 완전히 아가로스를 가수분해시키지 못하였다. 그러나 산과 온도조건이 높아짐에 따라 단당이 과분해되어 5-HMF 생성량 역시 증가하였다. 하지만, 산 농도, 온도 및 반응시간이 증가함에 따라 용해도가 증가하고 아가로바이오스 생성량도 증가하였다.

[59] 위 조건에 해당하는 반응 산물들의 종류를 분석하기 위해 TLC, GC/TOF-MS와 HPLC 분석을 실시하였다.

[60] TLC는 실리카 겔 플레이트에 1㎕의 효소 반응산물을 로딩하고 n-부탄올, 에탄올과 물을 3:1:1의 볼륨비율(v/v/v)로 섞은 이동상에 2시간 동안 전개시킨 뒤 10% 황산과 0.2%의 1,3-디하이드록시나프탈레인을 사용하여 발색시켰다.

[61] GC/TOF-MS 분석을 위한 유도체화 과정은 다음과 같다. 전 처리 반응 산물을 16,000×g에서 5분간 원심분리한 후 20㎕의 상등액을 스피드 백으로 건조시켰다. 유도체화를 위하여 건조시킨 샘플에 10㎕의 4%(w/v) 농도의 O-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine을 넣고 30℃에서 90분간 반응을 시킨 후, 45㎕의 N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37℃에서 30분간 반응을 시켰다. 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다. 분석 시 사용한 컬럼은 RTX-5Sil MS(30m×0.25mm i.d., 25 μm film thickness, Resteck) 이며 컬럼 온도는 먼저 50℃에서 1분간 유지하고 330℃까지 20℃/min으로 승온시킨 후 5분간 유지하였다. 1㎕의 샘플을 5의 split ratio로 분석하였다.

[62] HPLC 분석은 KS-802컬럼(쇼덱스)을 사용하여 컬럼온도 80℃ 조건 및 0.5 mL/min의 유속으로 샘플을 분석하였다. 이때 사용한 이동상은 물이다.

[63] 도 3a와 표 1에서 볼 수 있듯이 낮은 농도의 인산 조건에서는 높은 DP(Degree of Polymerization: 중합도)가 많이 생성되는 반면, 산 농도를 증가할수록 DP2인 아가로바이오스가 주로 생성되는 것을 확인하였으며, 그 중 1% 인산, 130℃, 5분 조건, 2% 인산, 110℃, 10분 및 120℃, 5분 조건에서 아가로바이오스가 각각 66.1, 67.0 및 70.0%로 가장 많이 생성되었고(도 3b), 이 조건에서 5-HMF 역시 둘 다 1.2%로 적게 생성되었다.

[64] <실시예 2> 아가로올리고당 가수분해효소(agarooligosaccharide hydrolase) 클로닝, 발현 및 정제

[65] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus* degradans) 2-40^T(ATCC 43961)을 주형으로 하기 프라이머를 사용하여 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 코딩하는 유전자를 PCR 반응을 통해 수득하였다:

[66] 정방향 프라이머:
5'-ATACATATGAATAGACTTACACTACCGCCTTCTTCTCGT-3';

[67] 역방향 프라이머:
5'-ATAGCGGCCGCGCTCCTACTCGAGACAAACTCAGCAAATGC-3'

[68] PCR 반응 혼합물 100㎕는 dNTP 250μM, 프라이머를 각각 20pmol, 1.5mM $MgCl_2$, 10×buffer 10㎕, DNA 주형100ng, pfu 폴리머라제 1 유닛을 첨가하였으며 95℃에서 5분 동안 초기 변성 과정을 거친 다음 95℃에서 1분 동안 변성,

55℃에서 30초 동안 어닐링 및 72℃에서 3분 동안 중합과정을 25회 반복하였다. 상기 PCR 반응으로 수득된 DNA 절편들은 NdeI/NotI 제한효소로 절단하고 1% 아가로스 젤에서 정제하고 동일한 제한효소로 절단한 pET21a 플라스미드에 라이게이션 하여 각각 pET21a-Sde_BAga를 제작하였다.

[69] 상기에서 제작한 플라스미드들을 에스케리치아 콜라이(*Escherichia* coli) BL21(DE3)에 도입하였다. 아가로올리고당 가수분해효소 유전자가 도입된 재조합 대장균을 전배양(pre-culture)하기 위해 50mL-conical tube에 엠피실린(ampicillin) 100㎍/mL가 있는 10mL의 LB broth에서 37℃, 9시간 배양하였다. 그 후, 전 배양액 2mL을 같은 배지 조성의 본 배양액 100mL에 접종한 후, 광학밀도분광기(Optical density spectroscope)을 이용하여 광학밀도 값이 미드익스포넨셜 단계(OD 0.4~0.6)까지 자라면 0.1mM 이소프로필-베타-디-씨오갈락토파이라노사이드(IPTG)를 넣고 30℃에서 16시간 동안 인덕션(induction) 시켰다. 그 후 세포 배양액을 4℃에서 20분간 16,000×g으로 원심분리를 한 뒤 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 트리스 버퍼(20mM Tris-HCl, pH 7.4) 30mL에 분산시킨 후 초음파기기(sonicator)를 이용하여 세포를 파쇄(cell lysis)하였다. 이후 4℃에서 10분 동안 16,000×g에서 원심분리 하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 포함된 재조합 효소를 히스트랩 컬럼(5mL, GE health care)을 사용하여 정제한 뒤, SDS-PAGE 젤을 사용하여 정제된 각각의 단백질의 크기를 확인하였다(도 4a). Desalting 컬럼을 사용하여 단백질 정제에 사용하였던 염(Imidazole)을 제거하였다. 염이 제거된 재조합 단백질 효소는 BCA assay 방법으로 농도를 정량하였다.

[70] <실시예 3> 아가로바이오스를 기질로 아가로올리고당 가수분해효소 반응을 이용한 AHG 생산

[71] 상기 실시예 1에서 확립한 조건인 2% 인산, 110℃ 및 10분 반응조건을 이용하여 30.7 wt%(w/v) 농도로 아가로스 및 아가를 반응시켰다(표 2). 사용한 아가로스와 아가는 모두 건조중량 기준이다.

[72] 아가로올리고당 가수분해효소 반응은 조건은 다음과 같다. 위의 조건으로 산 가수분해 시킨 반응물을 5M NaOH를 이용하여 pH5-6으로 중화한 후, 37℃, 200 rpm 조건에서 12시간 동안 반응을 실시하였다.

[73] 효소 반응 후 반응 산물은 thin layer chromatography(TLC)(도 4b)및 GC/TOF-MS와 HPLC(도 4c)를 통해 분석하였으며, TLC, GC/TOF-MS와 HPLC 분석 조건은 상기 실시예 1의 조건을 사용하였다.

[74] 도 4b 및 4c에서 나타낸 바와 같이, 아가로바이오스는 아가로올리고당 가수분해효소에 의해 AHG와 D-갈락토오스가 생성되는 것을 확인하였다. 이때 투입한 아가로스(g) 대비 수득된 AHG의 수율은 43.3% 였다.

[75] <실시예 4> 효모를 이용한 AHG 정제

[76] 실시예 3에서 획득한 반응 산물은 AHG와 D-갈락토오스이며, 이 중에서 D-갈락토오스를 제거하기 위하여 효모 배양을 실시하였다. 효모는

사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces* cerevisiae) D452-2 균주를 사용하였으며 전배양은 YPD broth에서 30℃, 200 rpm에서 24시간 동안 실시하였다. 배양 후 세포 펠렛을 6,000×g에서 10분간 원심분리를 통해 얻고 세포 펠렛은 Tris-HCl buffer(pH 7.4)를 사용하여 세척한 후 다시 한번 같은 조건에서 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다.

[77] 배양을 위해 3.35g/L의 이스트 나이트로젠 베이스(yeast nitrogen base) 및 0.4g/L의 CSM을 함유한 최소배지에 AHG와 D-갈락토오스가 있는 효소반응산물을 탄소원으로 하여 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*) D452-2의 세포 펠렛을 접종하였다. 30℃, 200rpm에서 42시간 배양 후 TLC 및 GC-TOF/MS를 이용하여 분석한 결과, D-갈락토오스는 모두 없어지고 AHG만 남은 것을 확인하였으며(도 5), AHG 수율을 계산한 결과 33.2%를 얻었다(표 2).

[78] [표2]

공정 단계		함량(g)		수율 (g product / 100 g input substrate)	
		아가로스	아가	아가로스	아가
공급	초기 기질	147.2	134.4	NA*	NA
산 가수분해	아가로바이오스 (DP2)	132.6	83.8	90.1	62.4
아가로올리고당 가수분해효소 처리	AHG/갈락토오스	63.4 / 70.5	29.2 / 32.9	43.3 / 47.9	21.8 / 24.5
효모 발효	AHG	48.8	22.5	33.2	16.7
* : 적용할 수 없음					

[79] <실시예 5> 기존 당화 공정별 수율 비교

[80] 본 발명에 따른 당화 공정과 종래 당화 공정별 단당수율 및 최대 기질 농도를 비교하였다. 그 결과는 표 3에 기재하였다.

[81] [표3]

아가로스 당화 방법	아세트산 전처리 및 Aga50D, ABG 및 NABH를 이용한 효소당화법 CH Lee et al. Process Biochem (2015)	Tris-HCl 버퍼 전처리 및 Aga50D, ABG 및 NABH를 이용한 효소당화법 CH Lee et al. Process Biochem (2015)	Aga16B, Aga50D 및 NABH를 이용한 효소당화법	본 발명
단당수율 (% of theoretical maximum)	50.5	44.9	72.5	62.6
최대 기질 농도 (w/v)	15%	5%	1%	30.7%

[82] 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명은 기존 공정에 비해 최대 기질 농도가 현저히 높았다.

[83] <실시예 6> 아가의 산 가수분해 조건 확립

[84] 기질로 20%(w/w)의 아가를 사용하는 것을 제외하고 상기 실시예 1과 같은 방법으로 1, 2, 3%(w/v) 인산에 대하여 90℃의 반응온도에서 480분(8시간) 간 가수분해시켰다.

[85] 도 6에 나타난 바와 같이, 시간이 지남에 따라 각 조건에서 당화율이 증가하였다.

[86] 위 조건에 해당하는 반응 산물들의 종류를 분석하기 위해 상기 실시예 1과 같은 방법으로 HPLC 분석을 실시하였다.

[87] 도 7a-c에 나타난 바와 같이, 1% 인산을 사용했을 때는 480분에 아가로바이오스의 농도가 143.3 g/L, 2% 인산 조건일 때, 270분에 아가로바이오스 농도가 162.5 g/L, 3% 인산일 때, 150분에 아가로바이오스 농도가 172.7 g/L에 상응하였다. 이는 넣어준 아가에 대비 각각 64%, 73% 및 77%에 해당하는 높은 수율이다. 부산물인 5-HMF의 양은 2% 및 3% 인산은 조건에서 각각 4.4 g/L 및 3.7 g/L으로 매우 적은 양이 생성되었다. 이것의 장점은 비교적 낮은 온도에서 산 가수분해를 함으로써, 비싼 고압반응기가 필요가 없으며, 작업 시 보다 안전하다는 장점이 있다.

산업상 이용가능성

[88] 본 발명은 고수율의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조에 사용할 수 있다.

[89]

청구범위

[청구항 1] 건조중량 기준으로 10 내지 37%(w/v)의 아가로스 또는 아가를 기질로 사용하여 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산을 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시킨 후 중화 과정을 수행하여 반응 산물 내 5-히드록시메틸퍼퓨랄(5-hydroxymethyl furfural)의 수율이 1.5%(w/w) 미만이 되는 아가로바이오스를 함유하는 반응 산물을 얻는 단계를 포함하는 아가로바이오스의 생산방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
강산은 인산, 황산, 염산 및 질산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 아가로바이오스의 생산방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
중화 과정은 강산 처리된 아가로스 또는 아가에 강염기를 부가하여 pH 5 내지 7로 조정하는 것인, 아가로바이오스의 생산방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
강염기는 NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$ 및 $Ba(OH)_2$로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 아가로바이오스의 생산방법.

[청구항 5] 건조중량 기준으로 10 내지 37%(w/v)의 아가로스 또는 아가를 기질로 사용하여 0.1 내지 5%(w/v) 농도의 강산과 80 내지 140℃에서 5분 내지 500분 동안 반응시킨 후 중화 과정을 수행하여 반응 산물 내 5-히드록시메틸퍼퓨랄(5-hydroxymethyl furfural)의 수율이 1.5%(w/w) 미만이 되는 아가로바이오스를 함유하는 반응 산물을 얻는 단계;
상기 반응 산물과, 아가로바이오스를 기질로 사용하는 아가로올리고당 가수분해효소(agarooligosaccharide hydrolase)를 반응시키는 단계; 및
상기 단계에서 얻은 가수분해산물 하에서 갈락토오스 대사능이 있는 미생물을 배양하고, 이의 배양액에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 수득하는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
강산은 인산, 황산, 염산 및 질산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

[청구항 7] 제5항에 있어서,
중화 과정은 강산 처리된 아가로스 또는 아가에 강염기를 부가하여 pH 5 내지 7로 조정하는 것인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

[청구항 8] 제6항에 있어서,
강염기는 NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$ 및 $Ba(OH)_2$로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

[청구항 9] 제5항에 있어서,
아가로올리고당 가수분해효소는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을

포함하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

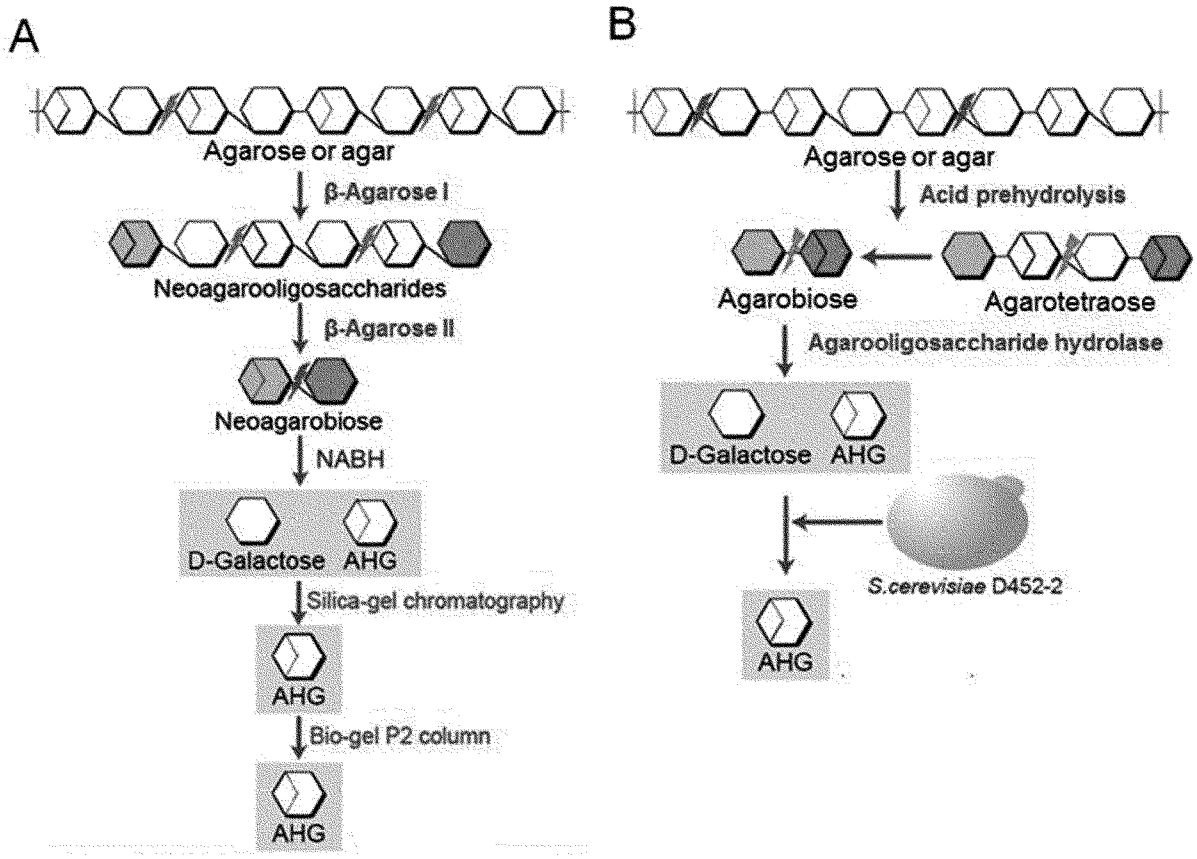
[청구항 10] 제5항에 있어서,
반응 산물과 아가로올리고당 가수분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 100 내지 300 rpm 조건으로 5시간 내지 48시간 동안 수행되는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

[청구항 11] 제5항에 있어서,
갈락토오스 대사능이 있는 미생물은 락토바실러스, 비피도박테리움, 바실러스, 스트렙토마이세스, 코리네박테리움, 자이모모나스, 대장균 또는 효모 중 어느 하나인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

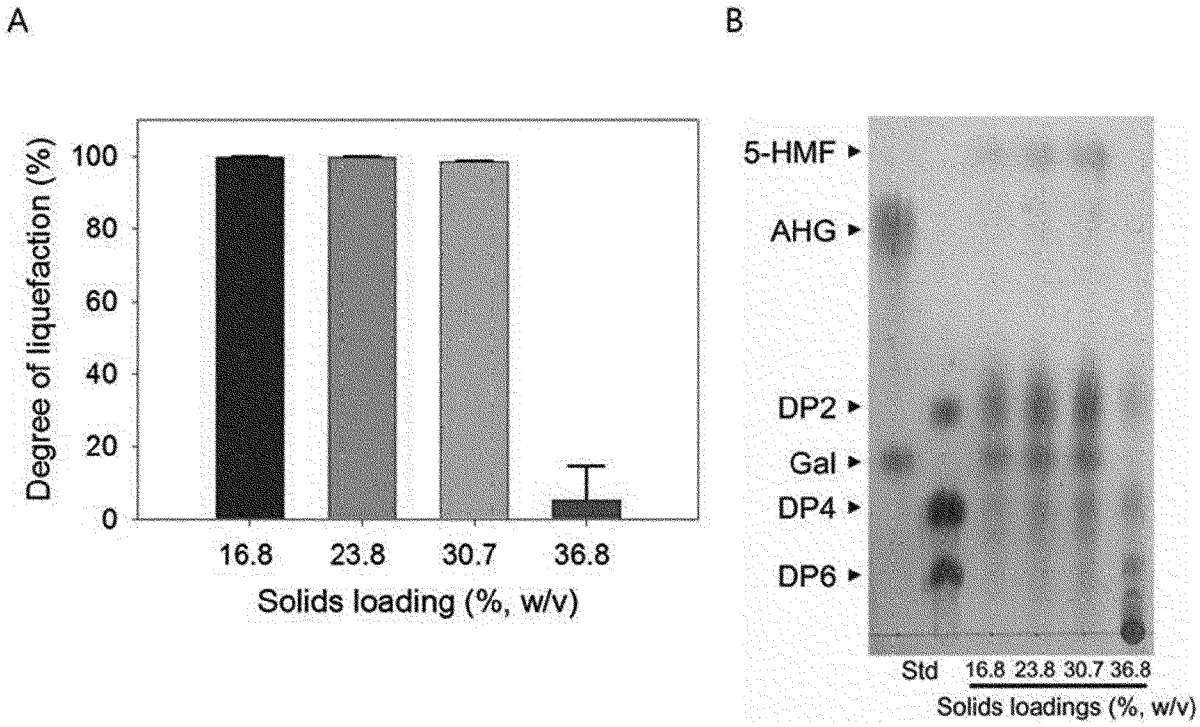
[청구항 12] 제5항에 있어서,
갈락토오스 대사능이 있는 미생물은 혐기 조건에서 배양하는, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

[청구항 13] 제5항에 있어서,
3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 수득하는 단계는 미생물 배양액을 원심분리 또는 여과하여 얻는 것인, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산방법.

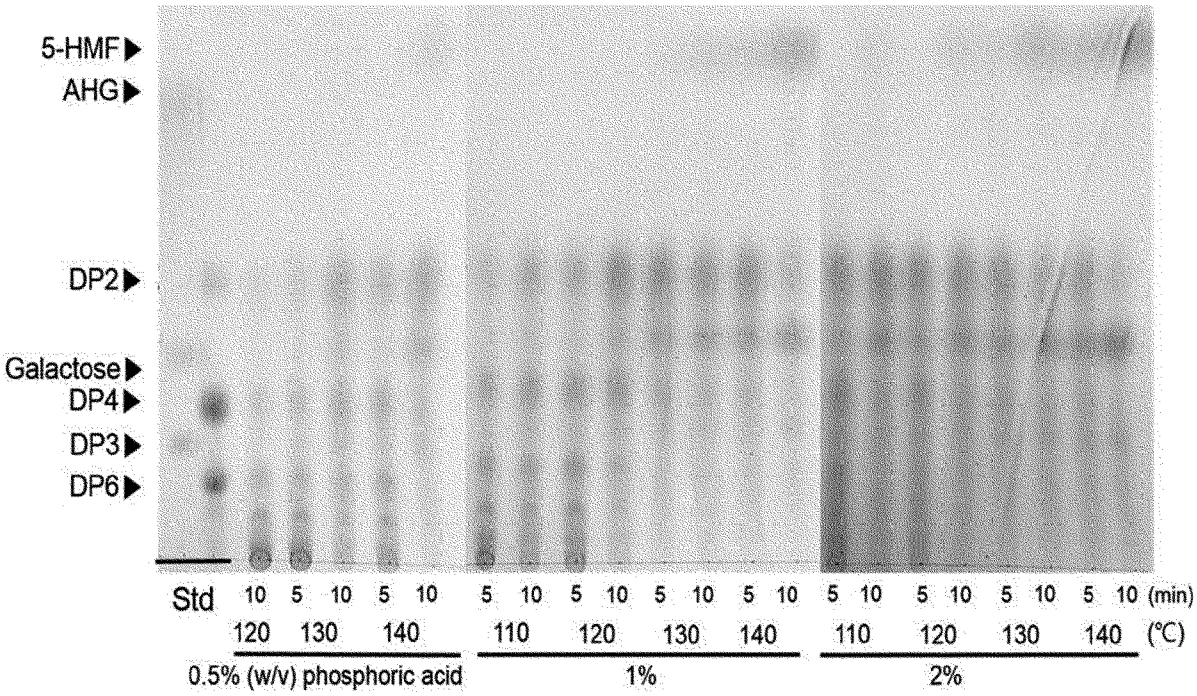
[도1]


A
Agarose or agar
β-Agarose I
Neoagarooligosaccharides
β-Agarose II
Neoagarobiose
NABH
D-Galactose AHG
Silica-gel chromatography
AHG
Bio-gel P2 column
AHG
B
Agarose or agar
Acid prehydrolysis
Agarobiose
Agarotetraose
Agarooligosaccharide hydrolase
D-Galactose AHG
S.cerevisiae D452-2
AHG

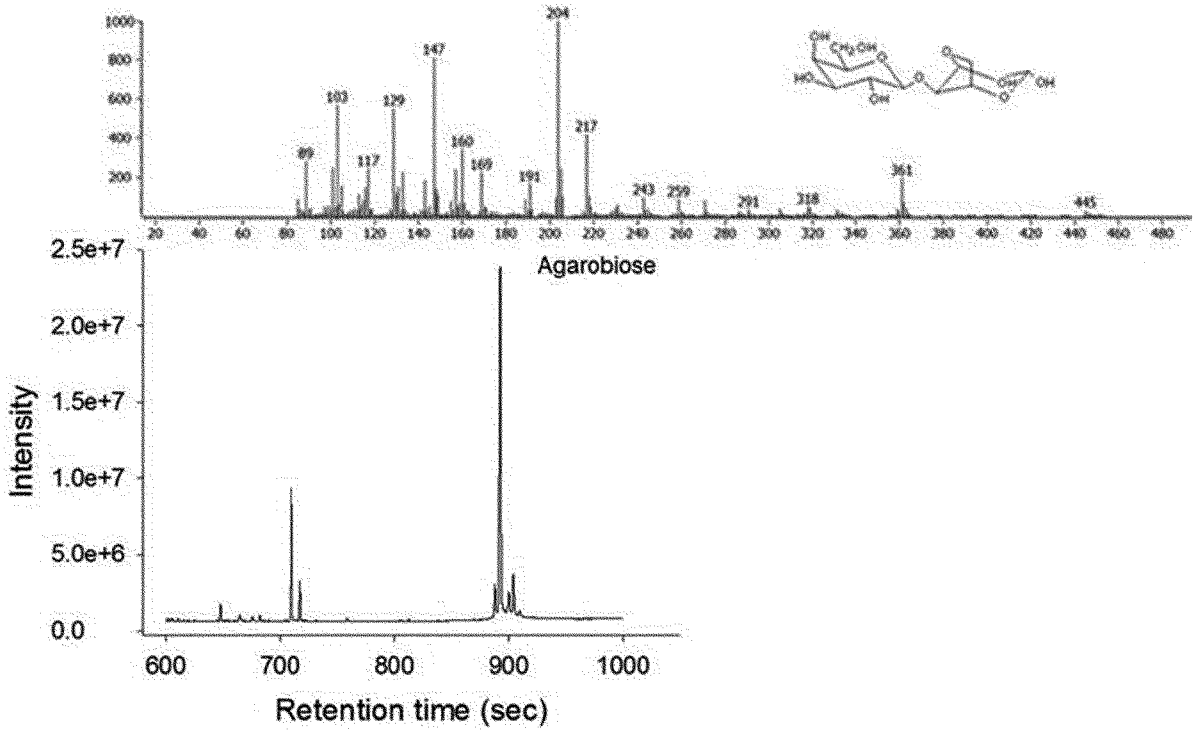
[도2]


A
Degree of liquefaction (%)
100
80
60
40
20
0
16.8
23.8
30.7
36.8
Solids loading (%, w/v)
B
5-HMF
AHG
DP2
Gal
DP4
DP6
Std
16.8 23.8 30.7 36.8
Solids loadings (%, w/v)

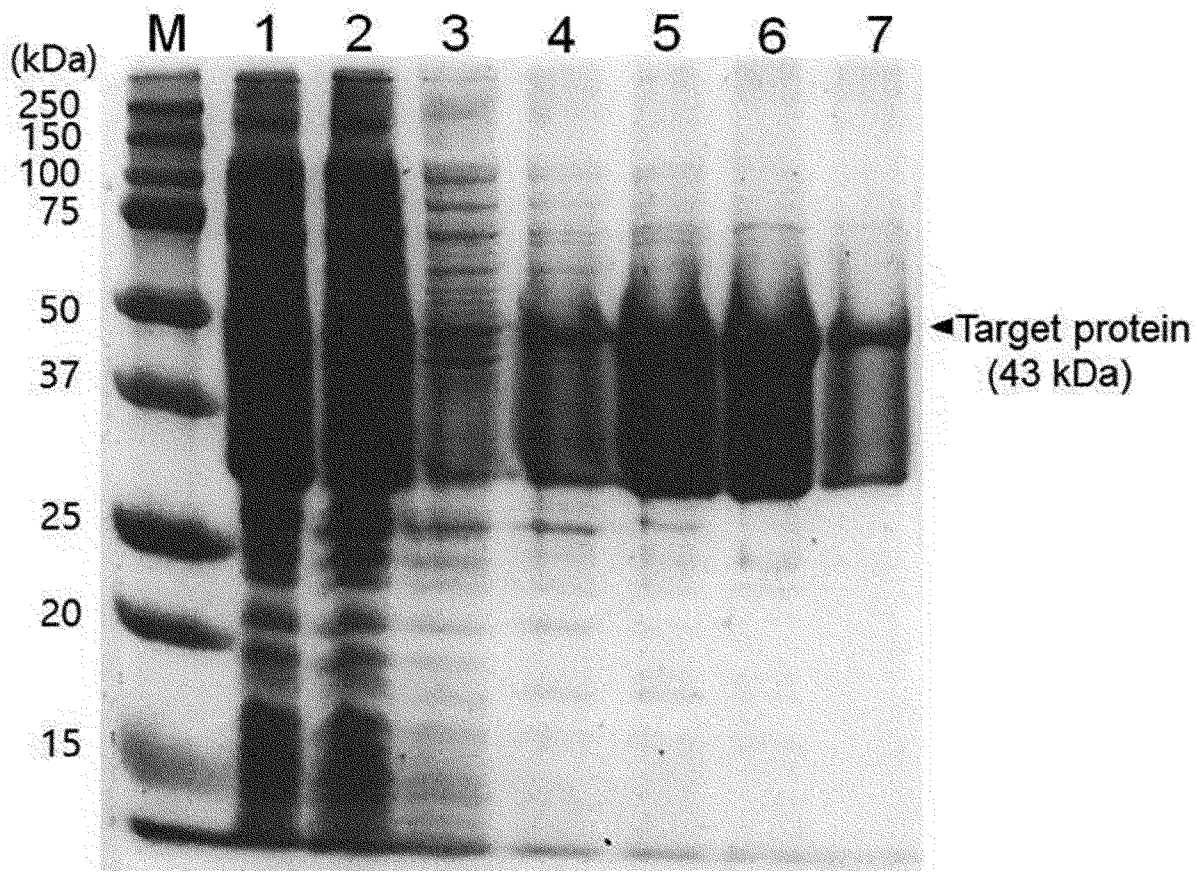
[도3a]


5-HMF
AHG
DP2
Galactose
DP4
DP3
DP6
Std
10 5 10 5 10 5 10 5 10 5 10 5 10 5 10 5 10 5 10 5 10 (min)
120 130 140 110 120 130 140 110 120 130 140 (℃)
0.5% (w/v) phosphoric acid
1%
2%

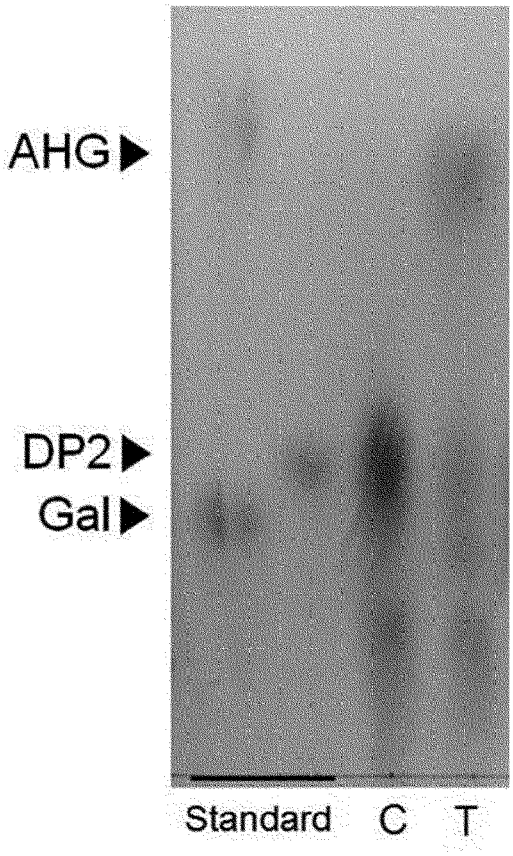
[도3b]


Agarobiose
Intensity
2.5e+7
2.0e+7
1.5e+7
1.0e+7
5.0e+6
0.0
600
700
800
900
1000
Retention time (sec)

[도4a]

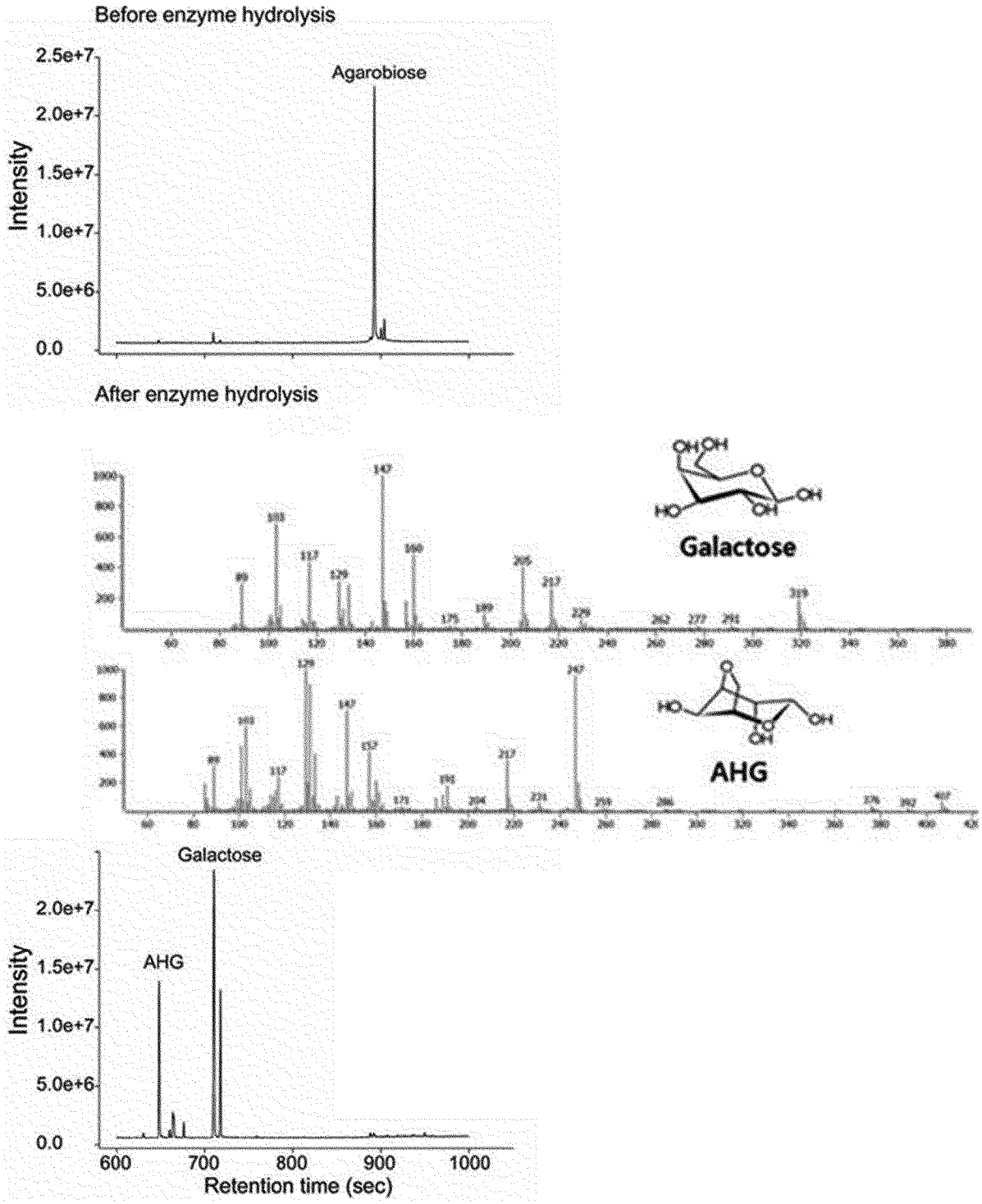


[도4b]

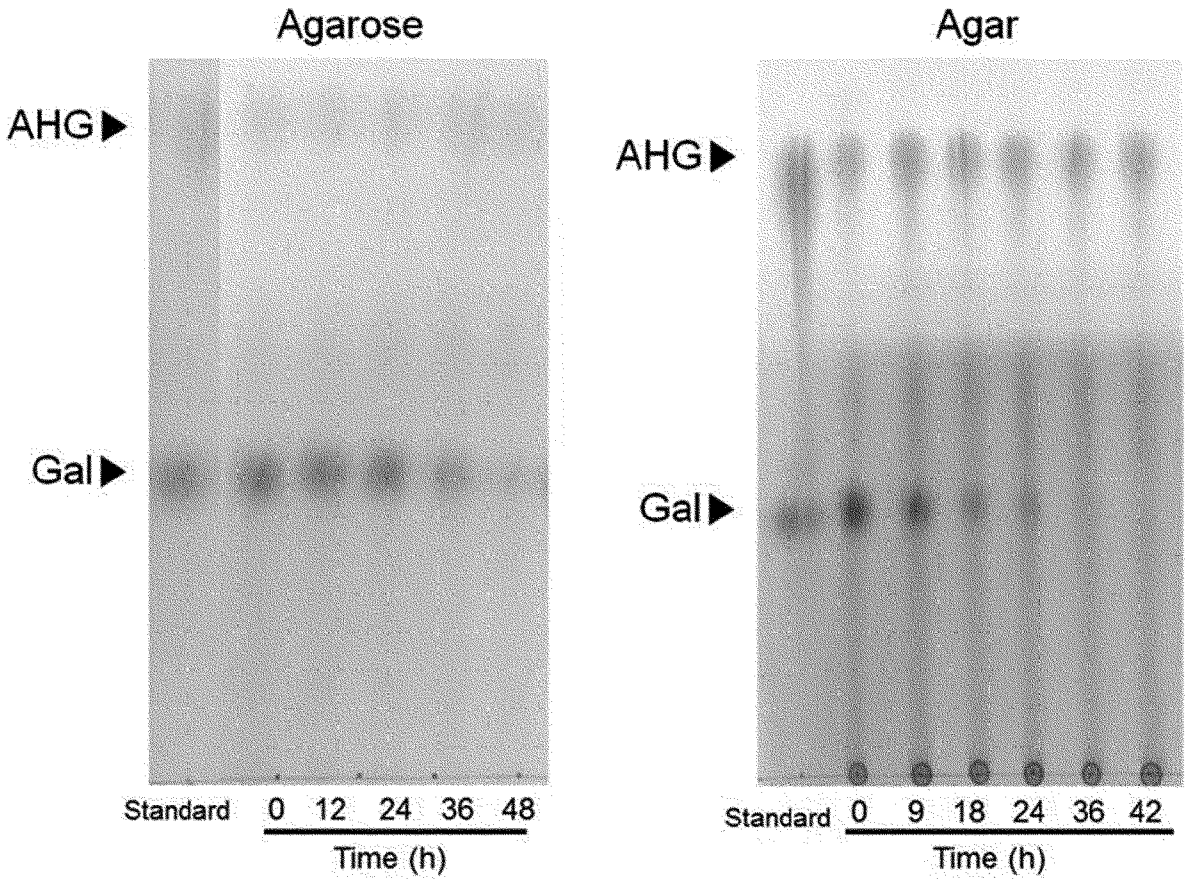


C : Control
T : Enzyme treated

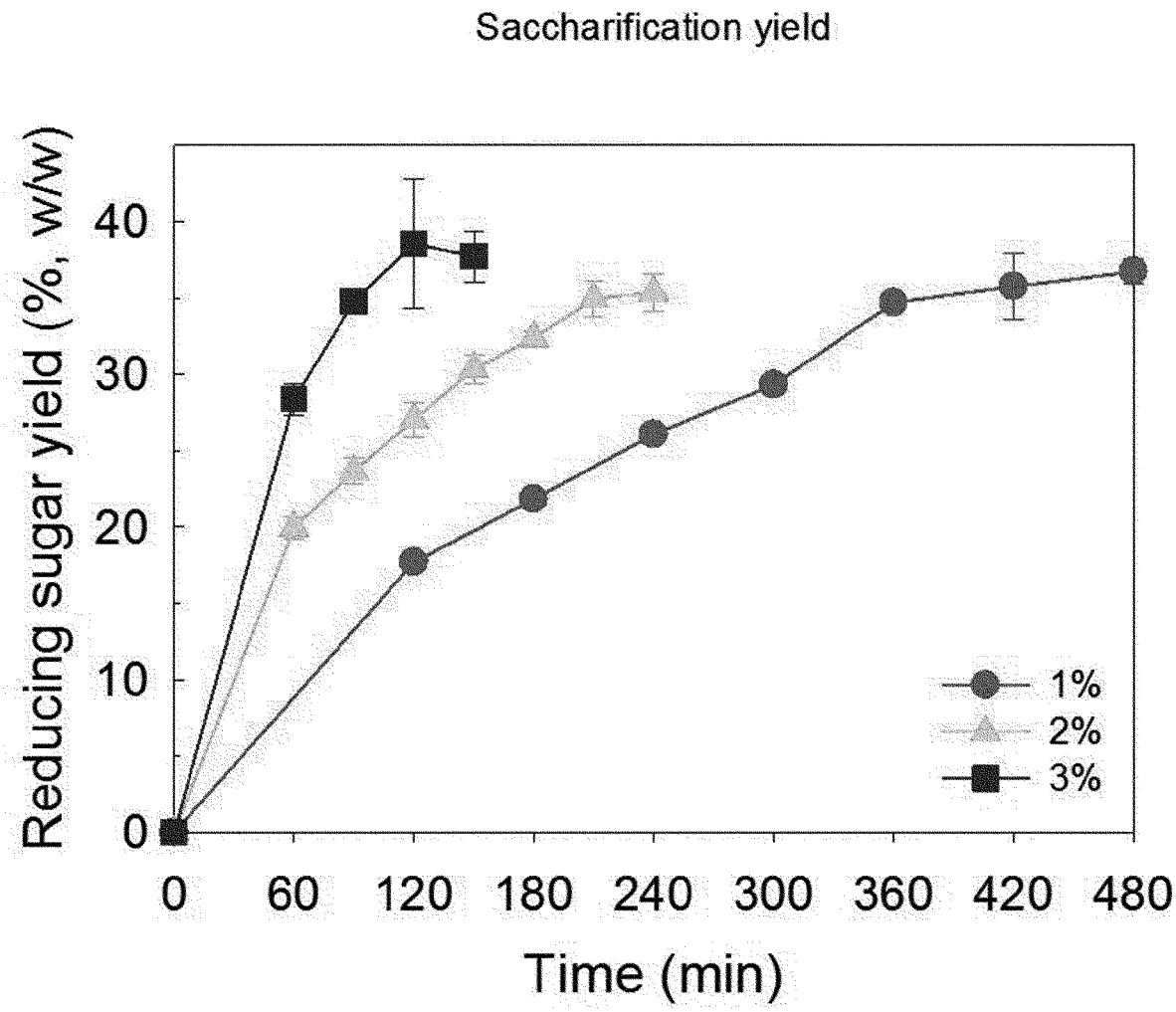
[도4c]


Before enzyme hydrolysis
Agarobiose
Intensity
2.5e+7
2.0e+7
1.5e+7
1.0e+7
5.0e+6
0.0
After enzyme hydrolysis
Galactose
AHG
Galactose
AHG
Intensity
600
700
800
900
1000
Retention time (sec)

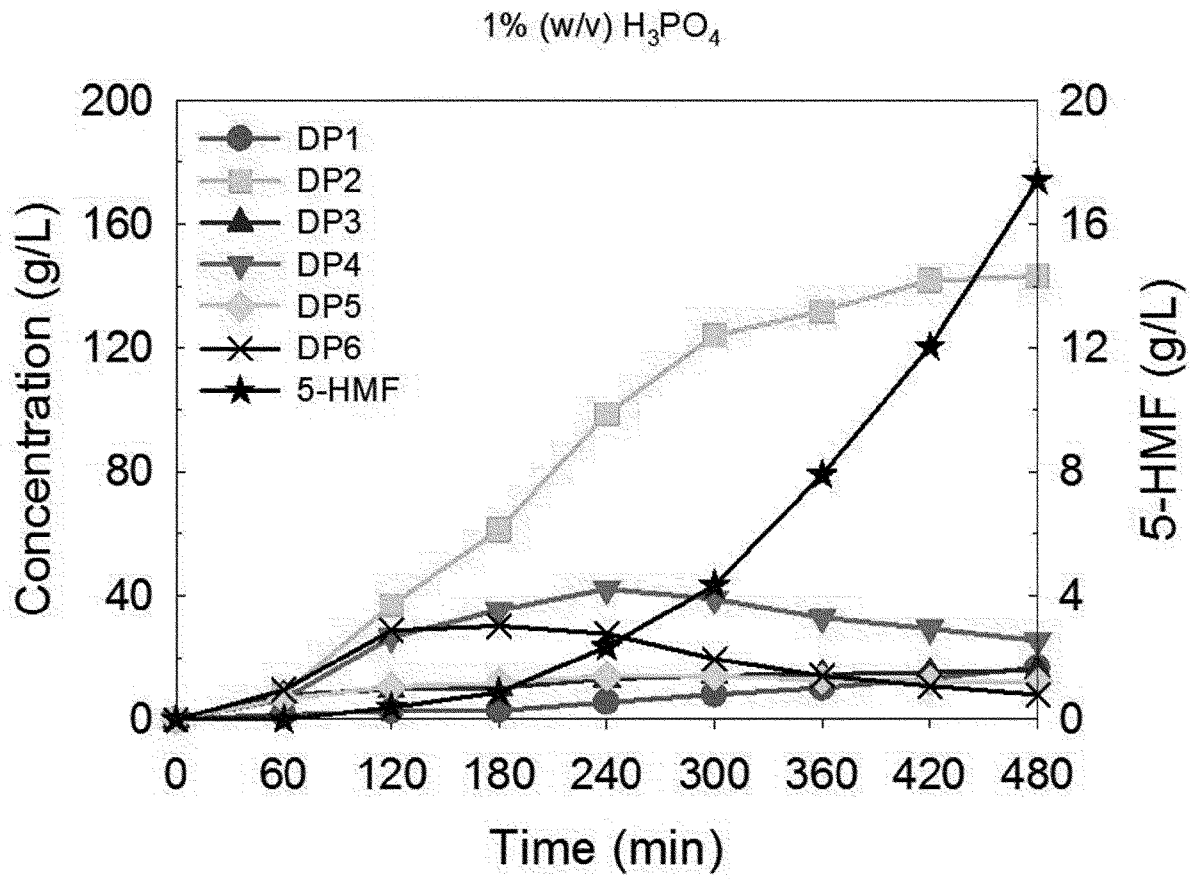
[도5]


Agarose
AHG
Gal
Standard
0
12
24
36
48
Time (h)
Agar
AHG
Gal
Standard
0
9
18
24
36
42
Time (h)

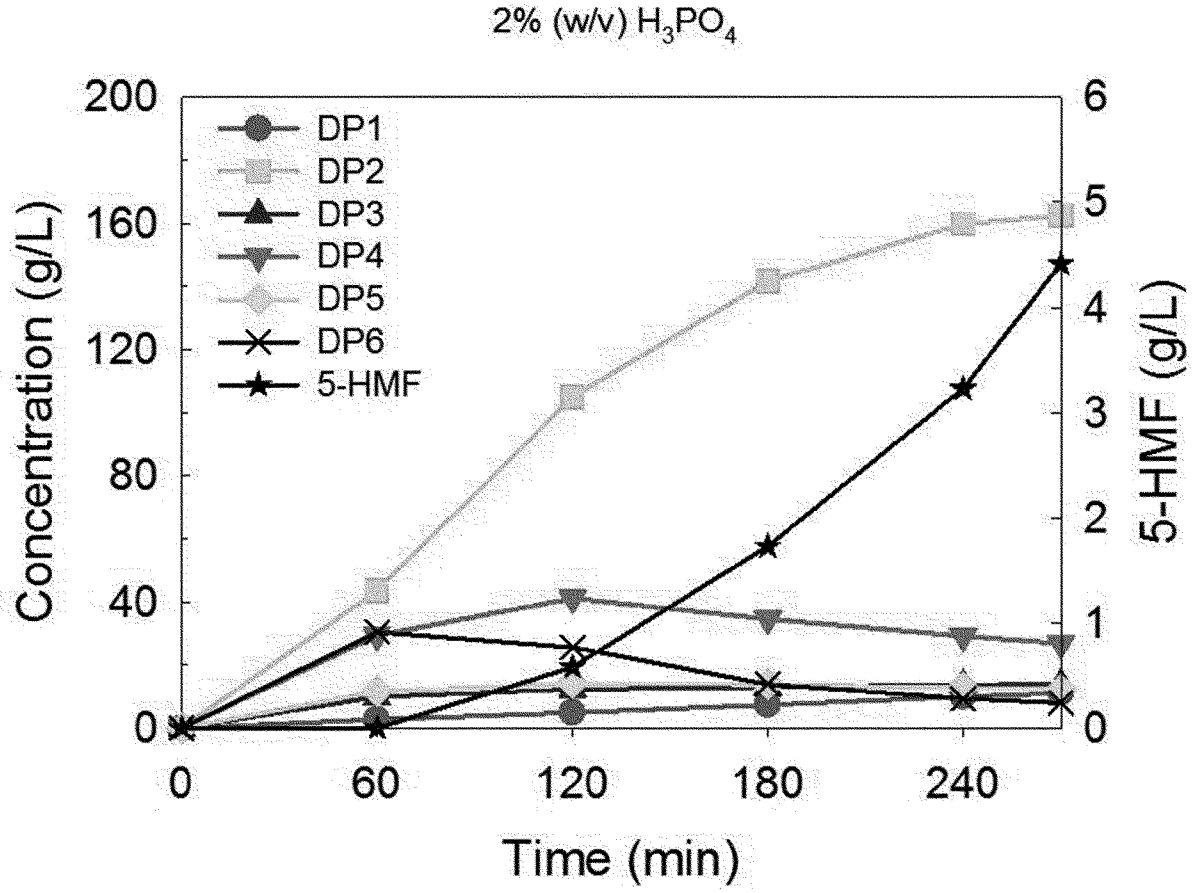
[도6]


Saccharification yield
Reducing sugar yield (%, w/w)
0
10
20
30
40
0
60
120
180
240
300
360
420
480
Time (min)
1%
2%
3%

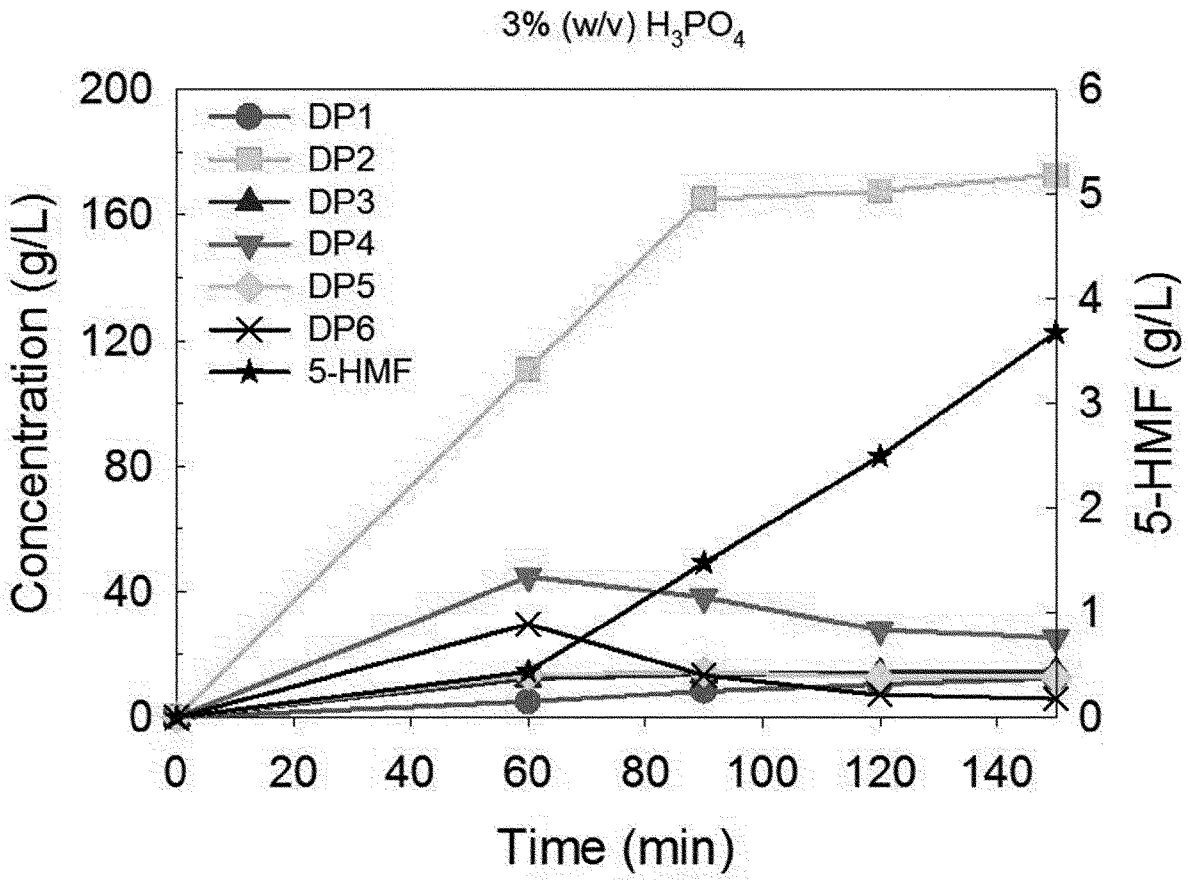
[도7a]


1% (w/v) H_3PO_4
Concentration (g/L)
5-HMF (g/L)
Time (min)
DP1
DP2
DP3
DP4
DP5
DP6
5-HMF
0
40
80
120
160
200
0
4
8
12
16
20
0
60
120
180
240
300
360
420
480

[도7b]


2% (w/v) H_3PO_4
Concentration (g/L)
5-HMF (g/L)
Time (min)
DP1
DP2
DP3
DP4
DP5
DP6
5-HMF
0
40
80
120
160
200
0
1
2
3
4
5
6
0
60
120
180
240

[도7c]


3% (w/v) H_3PO_4
DP1
DP2
DP3
DP4
DP5
DP6
5-HMF
Concentration (g/L)
5-HMF (g/L)
Time (min)
0
40
80
120
160
200
0
1
2
3
4
5
6
0
20
40
60
80
100
120
140

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/013493

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/12(2006.01)i, C12P 19/02(2006.01)i, C12P 19/14(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P 19/12; A61K 8/60; A61Q 19/02; C12P 19/02; C07H 3/02; C12N 9/24; C12P 19/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: agarobiose, 5-hydroxymethyl furfural, agarooligosaccharide hydrolase, 3,6-anhydro-L-galactose

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, Kyoung Heon, "Enzyme-based Red Algae Sugar Platform for the Production of Industrial Chemicals and Fuels", Key Joint Research Program Final Report, Ministry of Science and ICT, May 2014 See pages 9, 15, 24; figure 4; and table 1.	1-4
Y		5-13
Y	KR 10-2011-0072958 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 29 June 2011 See abstract; and paragraphs [0001], [0014].	5-13
Y	NCBI, GenPept accession no. WP_011467876.1 (06 February 2016) See all sequences.	9
A	KR 10-2015-0043040 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 22 April 2015 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2013-0085017 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 26 July 2013 See the entire document.	1-13

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 FEBRUARY 2018 (19.02.2018)	**19 FEBRUARY 2018 (19.02.2018)**
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. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/013493

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0072958 A	29/06/2011	KR 10-1087265 B1	29/11/2011
KR 10-2015-0043040 A	22/04/2015	CN 106414728 A	15/02/2017
		EP 3059309 A1	24/08/2016
		EP 3059309 A4	15/03/2017
		KR 10-1521711 B1	19/05/2015
		US 2016-0265012 A1	15/09/2016
		WO 2015-056923 A1	23/04/2015
KR 10-2013-0085017 A	26/07/2013	CN 105745329 A	06/07/2016
		JP 2015-505323 A	19/02/2015
		JP 2016-188251 A	04/11/2016
		JP 6022603 B2	09/11/2016
		KR 10-1573651 B1	02/12/2015
		KR 10-2015-0039159 A	09/04/2015
		US 2015-0216778 A1	06/08/2015
		US 2017-0071841 A1	16/03/2017
		WO 2013-109096 A1	25/07/2013

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/013493

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 19/12(2006.01)i, C12P 19/02(2006.01)i, C12P 19/14(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12P 19/12; A61K 8/60; A61Q 19/02; C12P 19/02; C07H 3/02; C12N 9/24; C12P 19/14

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 아가로바이오스, 5-히드록시메틸퍼퓨랄, 아가로올리고당가수분해효소, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	김경헌, `바이오화학소재 및 연료 생산을 위한 효소적 홍조류 슈가플랫폼', 핵심연구사업 최종보고서, 미래창조과학부, 2014.05 페이지 9, 15, 24; 그림 4; 및 표 1 참조.	1-4
Y		5-13
Y	KR 10-2011-0072958 A (고려대학교 산학협력단) 2011.06.29 요약; 및 문단 [0001], [0014] 참조.	5-13
Y	NCBI, GenPept accession no. WP_011467876.1 (2016.02.06) 전체 서열 참조.	9
A	KR 10-2015-0043040 A (고려대학교 산학협력단) 2015.04.22 전체 문헌 참조.	1-13
A	KR 10-2013-0085017 A (고려대학교 산학협력단) 2013.07.26 전체 문헌 참조.	1-13

☐ 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 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
2018년 02월 19일 (19.02.2018)	2018년 02월 19일 (19.02.2018)

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

심사관
김선희
전화번호 +82-42-481-5405

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/013493

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0072958 A	2011/06/29	KR 10-1087265 B1	2011/11/29
KR 10-2015-0043040 A	2015/04/22	CN 106414728 A	2017/02/15
		EP 3059309 A1	2016/08/24
		EP 3059309 A4	2017/03/15
		KR 10-1521711 B1	2015/05/19
		US 2016-0265012 A1	2016/09/15
		WO 2015-056923 A1	2015/04/23
KR 10-2013-0085017 A	2013/07/26	CN 105745329 A	2016/07/06
		JP 2015-505323 A	2015/02/19
		JP 2016-188251 A	2016/11/04
		JP 6022603 B2	2016/11/09
		KR 10-1573651 B1	2015/12/02
		KR 10-2015-0039159 A	2015/04/09
		US 2015-0216778 A1	2015/08/06
		US 2017-0071841 A1	2017/03/16
		WO 2013-109096 A1	2013/07/25