

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 11월 2일 (02.11.2017) **WIPO | PCT**



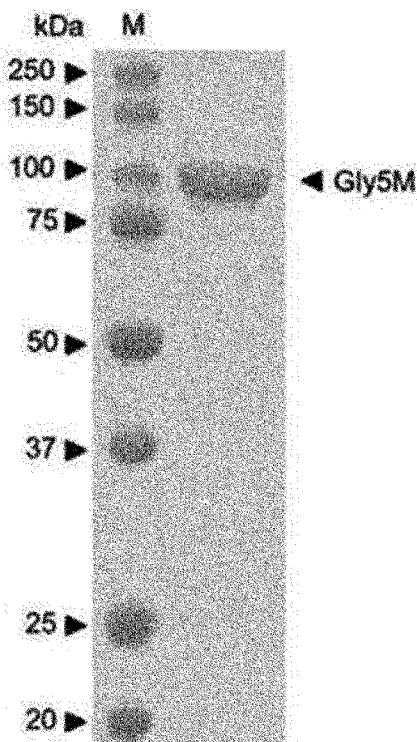
(10) 국제공개번호

WO 2017/188788 A1

- (51) 국제특허분류: *C12P 19/04* (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)
C12P 19/20 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004591
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 28일 (28.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0053414 2016년 4월 29일 (29.04.2016) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김경현 (KIM, Kyoung Heon); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초4동, 삼풍아파트), Seoul (KR). 왕대모 (WANG, Damao); 02841 서울시 성북구 안암로 145, CJ식품안전관 209호, Seoul (KR). 김도형 (KIM, Do-Hyoung); 16881 경기도 용인시 수지구 대지로 137, 107동 1401호 (죽전동), Gyeonggi-do (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, 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 국내 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

(54) Title: NOVEL B-1,3-1,6-ENDOGLUCANASE PRODUCING, FROM B-GLUCAN, OLIGOSACCHARIDES OR GLUCOSE

(54) 발명의 명칭: 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈



(57) Abstract: The present invention relates to a novel β -1,3-1,6-endoglucanase producing, from β -glucan, oligosaccharides or glucose. More specifically, the present invention provides an effect of producing oligosaccharides or glucose of various degrees of polymerization in high yields by using a β -1,3-1,6-endoglucanase exhibiting β -1,3-endoglucanase and β -1,6-endoglucanase activity on β -glucan and exhibiting transglycosylation activity on laminarioligosaccharide.

(57) 요약서: 본 발명은 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 베타-글루칸에 대해 베타-1,3-엔도글루카네이즈 뿐만 아니라 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 보이면서, 라미나리올리고당에 대해 트랜스글리코실화 활성을 보이는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈를 통해 다양한 중합도의 올리고당 또는 글루코스를 고수율로 생산하는 효과를 제공한다.

(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: 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈

기술분야

- [1] 본 발명은 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산하는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현재 세계적으로 석유자원의 고갈에 따른 유가의 상승과 기후변화협약을 통한 환경규제가 강화됨에 따라 기존의 석유 및 석탄 등의 화석연료를 대체할 수 있는 친환경적 에너지 자원의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 다양한 다당류로 이루어진 갈조류는 목질계, 초본계 바이오매스에 비해 빠른 속도로 성장하며 경지 면적당 높은 생산성을 보이는 장점을 가지고 있다. 또한, 리그닌 함량이 적어 바이오에너지 및 화학물질의 생산을 위한 원료물질로의 전환이 수월하며 광합성 작용으로 공기 중의 이산화탄소를 흡수하므로 친환경, 경제적 바이오에너지 및 화학물질의 생산을 위한 자원으로 각광받고 있다.
- [3] 갈조류는 알긴산, 후코이단, 만니톨, 라미나린 등으로 구성되어 있으며 그 중 라미나린은 종에 따른 차이가 있으나 라미나리아 하이퍼보린(*Laminaria hyperborean*), 사카리나 라티시마(*Saccharina latissimi*) 건조중량의 약 32%, 푸쿠스 베시쿨로수스(*Fucus vesiculosus*)의 전체 탄수화물 중 약 85%를 차지하는 등 갈조류 유래 다당류 중 매우 많은 구성비를 차지하고 있다. 라미나린은 β -1,3-글리코시드 결합이 주 골격이며 부분적으로 β -1,6-글리코시드 결합으로 이루어져 있다. 라미나린을 효과적으로 당화하기 위해서는 글리코시드 결합을 절단하는 글리코시드 하이드롤레이즈(glycoside hydrolases(GHs))가 필요한데, 그 중 β -1,3-글루카네이즈의 경우 그 효소적 특성에 따라 2개의 그룹으로 나뉘게 된다. β -1,3-엔도글루카네이즈는 내부의 β -1,3 글리코시드 결합을 절단함으로써 다양한 올리고당을 생산하며 β -1,3-엑소글루카네이즈는 비-환원 말단으로부터 글루코스를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이러한 효소적 반응을 통해 생산된 최종산물인 글루코스는 에탄올 등 바이오 연료의 생산에 적합한 원료로 사용가능하며, 또한 본 효소반응을 통해 생산되는 라미나리올리고당 역시 유용한 생리활성 물질로써의 사용이 가능하다.
- [4] 베타-1,3-엔도글루카네이즈와 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-1483182호에는 베타-1,3-엔도글루카네이즈가 라미나린을 분해하여 글루코스와 라미나리바이오스를 생산한다고 기재하고 있으나, 상기 효소의 푸스톨란에 대한 반응성은 언급하고 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 베타-글루칸으로부터 올리고당 또는 글루코스를 생산할 수 있는 신규한 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)를 포함하고, 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스톨란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물을 제공한다.

- [7] 본 발명은 또한 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)와, 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스톨란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 올리고당 또는 글루코스의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [8] 본 발명은 베타-글루칸에 대해 베타-1,3-엔도글루카네이즈 뿐만 아니라 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 보이면서, 라미나리올리고당에 대해 트랜스글리코실화 활성을 보이는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈를 제공하는 효과가 있다.
- [9] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 라미나린, 푸스톨란, 라미나리올리고당을 기질로 사용할 수 있어 다양한 중합도의 올리고당 또는 글루코스를 고수율로 생산하는 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 발현을 확인한 젤 사진도이다.
- [11] 도 2는 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 활성 pH 확인 결과이다.
- [12] 도 3은 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 활성 온도 확인 결과이다.
- [13] 도 4는 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 열 안정성 확인 결과이다.
- [14] 도 5는 기질, 라미나린의 가수분해에 대한 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 Lineweaver-Burk plot를 나타낸 것이다.
- [15] 도 6은 기질, 라미나린에 따른 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 TLC(a) 및 HPLC(b) 분석 결과이다.
- [16] 도 7은 기질, 푸스톨란에 따른 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 TLC(a) 및 HPLC(b) 분석 결과이다.

- [17] 도 8은 기질, 라미나린(a) 및 푸스톨란(b)에 따른 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 MALDI-TOF/TOF MS 분석 결과이다.
- [18] 도 9는 기질, 라미나리올리고당에 대한 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 TLC 분석 결과이다.
- [19] 도 10a-c는 기질, 라미나리올리고당에 대한 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈 반응 산물의 MALDI-TOF/TOF MS 분석 결과이다.
- [20] 도 11은 본 발명의 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 계통수를 도시한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [21] 본 발명자들은 베타-글리코시데이즈 활성을 가질 것으로 추정되는 GH5 패밀리에 속한 Gly5M 단백질의 베타-글루칸 분해 활성을 확인하였다. 그 결과, Gly5M 단백질은 포도당이 베타-1,3-결합의 주 골격과 및 베타-1,6-결합으로 결합되어 연결된 다당류인 라미나린을 기질로 사용하여 라미나린의 β -1,3-글리코시드 결합을 절단함으로써 라미나리올리고당과 글루코스를 생산하고, 포도당이 베타-1,6-결합으로 연결된 다당류인 푸스톨란 기질의 β -1,6-글리코시드 결합을 절단함으로써 젠티오올리고당과 글루코스를 생산하였다. 또한, 라미나리올리고당을 기질로 사용할 경우 트랜스글리코실화 활성을 나타내어 기질인 라미나리올리고당보다 높은 DP 값을 가지는 올리고당을 생산함을 확인하였다. 이러한 Gly5M 단백질의 다양한 효소적 특성은 GH5 패밀리에 속하는 다른 효소들이 가지고 있지 않은 β -1,3-엔도글루카네이즈 활성을 보임으로써 이전까지 알려지지 않은 GH5 패밀리 효소들에 대한 새로운 정보를 제공하였다.
- [22] 따라서, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)를 포함하고, 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스톨란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물을 제공한다.
- [23] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈와, 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스톨란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 올리고당 또는 글루코스의 생산방법을 제공한다.
- [24] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 베타-글루칸에 대해 베타-1,3-엔도글루카네이즈 뿐만 아니라 베타-1,6-엔도글루카네이즈 활성을 보이면서, 라미나리올리고당에 대해 트랜스글리코실화 활성을 나타내는 것을

특징으로 한다.

- [25] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 약 20 내지 약 45°C까지 열 안정성을 유지하고, 라미나린, 라미나리올리고당 또는 푸스톨란에 대해 최적 분해 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다. 더 구체적으로, 약 30 내지 40°C에서 최적 활성을 나타낼 수 있다.
- [26] 또한, 완충 용액 내 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈의 최적 pH는 완충용액의 종류에 따라 달라질 수는 있으나 약 pH 4 내지 10일 수 있고, 더 구체적으로 약 pH 4 내지 9, 가장 구체적으로 약 pH 6일 수 있다.
- [27] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 라미나린, 푸스톨란 및 라미나리올리고당 등을 기질로 사용할 수 있다.
- [28] 상기 기질로 사용하는 라미나리올리고당은 더 구체적으로, 중합도(degrees of polymerizations, DP) 2 내지 6의 라미나리올리고당 중 어느 하나일 수 있다. 예컨대, 라미나리바이오스(DP2), 라미나리트리오스(DP3), 라미나리테트라오스(DP4), 라미나리펜타오스(DP5), 또는 라미나리헥사오스(DP6)일 수 있다. 상기 중합도 2 내지 6의 라미나리올리고당을 기질로 사용하는 경우, 트랜스글리코실화 활성을 통해 기질의 DP 값보다 높은 DP 값을 보이는 피크의 라미나리올리고당이 분해 산물로 획득될 수 있다.
- [29] 또한, 상기 효소의 반응 산물은 라미나리올리고당, 젠티오올리고당, 또는 글루코스일 수 있다.
- [30] 상기 라미나리올리고당은 중합도 2 내지 17의 라미나리올리고당 중 어느 하나일 수 있다. 더 구체적으로, 중합도 2 내지 6의 라미나리바이오스, 라미나리트리오스, 라미나리테트라오스, 라미나리펜타오스 또는 라미나리헥사오스가 다량 생성될 수 있다.
- [31] 상기 젠티오올리고당은 중합도 2 내지 8의 젠티오올리고당 중 어느 하나일 수 있다. 더 구체적으로, 중합도 2의 젠티오바이오스가 다량 생성될 수 있다.
- [32] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 사카로파거스 데그라단스 (*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [33] 또한, 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 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 올리고당 또는 글루코스의 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.

- [34] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 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.
- [35] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 예컨대, 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈를 코딩하는 유전자, 즉, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다. 상기 숙주세포로 대장균을 사용하나, 이에 제한하는 것은 아니다.
- [36] 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈와 기질의 반응은 20 내지 45°C의 온도 범위에서, pH 5 내지 10에서, 5분 내지 1일 동안 수행될 수 있다. 보다 구체적으로, 기질로 라미나린 또는 푸스톨란을 사용하는 경우, 38 내지 42°C의 온도 범위에서, pH 5 내지 7에서, 5분 내지 5시간 동안 수행될 수 있다. 기질로 라미나리올리고당을 사용하는 경우, 38 내지 42°C의 온도 범위에서, pH 5 내지 7에서, 1시간 내지 5시간 동안 수행될 수 있다.
- [37] 상기 효소의 분해산물은 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 95%의 고순도의 올리고당 또는 글루코스를 분리 정제할 수 있다.
- [38] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.
- [39] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 *Proc.Natl Acad. Sci USA* 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin,

Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

- [40] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "제조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 제조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)제조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [41] 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 축적되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.
- [42] 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.
- [43] 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

- [44] <실시예 1> 클로닝 기법을 통한 *gly5m* 유전자의 확보
- [45] 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T(ATCC 43961)는 23 g/L의 인스턴트 해수염, 50 mM Tris-HCl, 2 g/L의 글루코스, 2 g/L의 효모 추출물 및 0.5 g/L의 암모늄 클로라이드를 함유하는 최소배지에서 30°C에서 12시간 동안 배양하였다.
- [46] 시판중인 DNA 분리 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T(ATCC 43961)의 게놈 DNA를 얻었다. 표적 유전자 *gly5m*(GeneBank ID. ABD82251.1)는 Solg 2×Taq PCR smart mix 2(SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 증폭하였다. 사용된 프라이머는 5'-GCGGGATCCATGAGAGAAAACTACTGCGCG-3'(정방향) 및 5'-GCGCTCGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCAACTGCTTCAACACTCCA-3'(역방향)이고 이들은 5' 부위에 *Bam*HI 및 *Xho*I 제한효소 사이트를 가지고 있다. 또한 HisTrap 컬럼의 친화도를 높이기 위해 히스티딘을 코딩하고 있는 유전자의 염기서열에 추가하였다. PCR 산물과 pET28a+ 벡터는 *Bam*HI 및 *Xho*I 으로 이중 절단하고, 최종 DNA 단편을 라이게이션 하였다. *gly5m*이 탑재된 플라스미드는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5α에 형질전환 하였다.

[47] <실시예 2> Gly5M의 과발현 및 정제

[48] 실시예 1을 통해 확보한 유전자의 과발현을 위해 단백질 발현용 숙주인 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) B121(DE3)에 형질전환 하였다. 세포는 50 mg/L의 카나마이신(kanamycin)이 첨가된 Luria-Bertani(LB) broth(BD, Sparks, MD, USA)를 사용하여 37°C에서 600 nm에서의 흡광도가 0.6에 도달할 때까지 배양하였다. 0.1 mM IPTG를 사용하여 단백질의 발현을 유도하였으며 유도 온도는 16°C로 설정하여 수용성 형태로 재조합 단백질을 발현하였다. 발현시킨 Gly5M 단백질을 분리하기 위하여, 세포를 초음파로 분쇄하고 원심분리 후 그 상등액을 HisTrap column(GE Healthcare, Piscataway, USA)을 이용해 정제하였다. 정제된 단백질을 Amicon Ultra Centrifugal filter(millipore, Billerica, MA, USA)로 농축하고, bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)로 단백질 농도를 측정하였다.

[49] 발현된 Gly5M의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 대략 95kDa으로 측정되었다(도 1).

[50] <실시예 3> Gly5M의 기질특이성 및 양이온 효과 확인

[51] Gly5M 단백질의 기질 특이성을 확인하기 위해 1%의 푸스톨란, 라미나린, 커들란(Wako, Osaka, Japan), 카복시메틸셀룰로즈(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 자일란(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 등과 같은 다양한 글루칸을 포함하는 20 mM Tris-HCl(pH6.0)에서 10.5 μ M의 Gly5M 단백질과 함께 40°C에서 30분간 반응시켰다. 생산된 환원당은 DNS 방법을 이용해 측정하였다.

[52] 표 1에 나타난 바와 같이, Gly5M 단백질은 라미나린에서 가장 높은 활성을 보였으며 푸스톨란을 기질로 사용하였을 경우 라미나린을 단독 기질로 사용하였을 경우와 비교하여 약 55.6%의 상대활성을 보였다. Gly5M 단백질은 다른 β -글루카네이즈와는 달리 커들란을 가수분해하지 않는 것으로 확인되었으며, 이는 라미나린과 비교해 커들란에 매우 활성을 보이는 β -1,3-글루카네이즈의 특징과 매우 유사하다. 또한, Gly5M 단백질은 아비셀, 보리의 β -글루칸, CM-셀룰로스, 자일란과 같은 β -1,4-글리코시드 결합에는 반응하지 않는 것으로 확인되었다.

[53] Gly5M 단백질의 양이온효과를 확인한 결과, 표 2와 같이, Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} 과 같은 양이온에 의해 반응성이 저해되는 것을 확인하였다.

[54] [표1]

기질	글리코시드 결합	상대 효소 활성 (%)
라미나린	β -1,3 및 β -1,6 (글루코스)	100.0
푸스톨란	β -1,6 (글루코스)	55.6
커들란 β -글루칸 (보리)	β -1,3 (글루코스) β -1,3 및 β -1,4 (글루코스)	ND ND
자일란	β -1,4 (자일로스)	ND
아비셀	β -1,4 (글루코스)	ND
카르복시메틸 셀룰로스	β -1,4 (글루코스)	ND
ND는 검출되지 않았다는 의미임		

[55] [표2]

양이온	상대 활성 (%)
대조군	100.2 $\pm$ 0.9
K ⁺	99.1 $\pm$ 1.4
Na ⁺	100.3 $\pm$ 1.4
Mg ²⁺	63.1 $\pm$ 1.2
Ca ²⁺	103.4 $\pm$ 2.9
Mn ²⁺	101.7 $\pm$ 0.8
Ni ²⁺	22.5 $\pm$ 1.2
Cu ²⁺	25.3 $\pm$ 0.2
Fe ²⁺	20.7 $\pm$ 1.1
Co ²⁺	56.8 $\pm$ 0.7
양이온이 없는 상태의 활성을 100%로 정함	
실험 데이터는 3반복 실험치의 평균 $\pm$ 표준편차임	

[56] <실시예 4> Gly5M 단백질의 최적 pH 및 활성 온도 확인

[57] Gly5M 단백질의 활성에 대한 최적 pH를 조사하기 위해 2% 라미나린을 포함하는 20 mM glycine-HCl(pH 2.0-4.0), 20 mM 소듐 아세테이트(pH 4.0-6.0), 20

mM Tris-HCl(pH 6.0-9.0), 20 mM glycine-NaOH(pH 9.0-10.0)과 Gly5M 단백질을 반응하였다.

[58] 도 2는 2.0-10.0 범위의 pH에서 Gly5M의 상대적 활성을 나타낸다. Gly5M은 pH 6.0일 때 최대 활성을 나타내었고 그 전후의 pH에서 급격하게 효소활성이 떨어지는 것을 확인하였다.

[59] Gly5M 단백질의 활성에 대한 최적 온도를 조사하기 위해 2% 라미나린을 포함하는 20 mM Tris-HCl과 Gly5M을 반응시켰다.

[60] 도 3은 20-70°C 범위의 온도에서 Gly5M의 상대적 활성을 나타낸 것이다. 효소 활성은 20°C에서 40°C 범위에서는 온도가 증가함에 따라 점차적으로 증가하여 40°C에서 최대 값에 도달하였다. 40°C의 반응온도에서의 활성은 40°C에서 관찰한 것과 비교하여 효소 활성이 급격히 감소하였다.

[61] Gly5M의 열 안정성을 확인하기 위해, 40°C 이상의 온도에서 1시간 반응한 40°C에서 반응한 경우와 비교해보았을 때 상대활성이 급격히 줄어듦을 확인하였다(도 4). 따라서 30°C를 Gly5M의 최적 반응 온도로 결정하였고 이 온도를 모든 후속 실험에 사용하였다.

[62] <실시예 5> Gly5M의 효소 반응속도 확인

[63] Gly5M 단백질의 라미나린에 대한 효소 반응속도를 확인하기 위하여 0.45-9.1%의 다양한 농도의 라미나린을 포함하는 20mM Tris-HCl 완충용액과 단백질을 pH 6.0, 40°C에서 반응시켰다.

[64] 그 결과, Lineweaver-Burk plot(도 5)으로부터 K_m , V_{max} , K_{cat} 값은 각각 10.4 g/L, 10.6 U/mg, 16.8 s⁻¹ 로 확인되었다.

[65] <실시예 6> TLC, HPLC를 사용한 Gly5M 단백질의 효소 반응 특성 확인

[66] 반응 시간에 따른 Gly5M 단백질의 효소 반응 특성은 Thin Layer Chromatography(TLC) 및 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 사용하여 분석하였다.

[67] TLC 분석을 위한 반응산물은 *n*-부탄올:아세트산:물(3:2:2 부피비) 혼합용매 시스템을 사용하여 silica gel 60 plate(Merck)에 전개하였으며 시각화를 위해 10% (v/v) 황산 처리 후 130°C에서 5분간 열처리하였다.

[68] HPLC 분석은 gel permeation and ligand exchange column(KS-802; Shodex)을 장착한 Agilent 1100 HPLC(Agilent)를 사용해 분석하였으며 refractive index detector(Agilent)를 통해 탐지하였다. HPLC 분석을 위한 용매로는 멸균수를 사용하였으며 flow rate은 0.5 mL/min, 컬럼 온도는 80°C로 설정하였다. 분석을 위한 표준물질로는 라미나리바이오스(DP2), 라미나리트리오스(DP3), 라미나리테트라오스(DP4), 라미나리펜타오스(DP5), 라미나리헥사오스(DP6)(Megazyme)를 사용하였다.

[69] Gly5M 단백질과 라미나린을 반응한 반응산물의 TLC 분석결과(도 6a), 반응시작 5분 이후부터 다양한 DP 값을 보이는 올리고당이 생성되는 것을 확인할 수 있으며, 시간이 지남에 따라 DP2에서 DP5에 해당하는 낮은 DP값의

올리고당과 글루코스가 다량 생성됨을 확인하였다.

[70] 동일한 반응 산물을 HPLC를 통해 분석한 결과(도 6b), 반응시간이 지남에 따라 DP5 보다 낮은 DP 값을 보이는 피크가 증가하는 것을 확인하였다. 이 결과는 Gly5M 단백질이 라미나린을 구성하는 β -1,3-글리코시드 결합을 무작위적으로 절단함을 의미한다.

[71] Gly5M 단백질과 푸스톨란을 반응시킨 경우, 반응이 진행됨에 따라 초기에는 다양한 DP 값을 보이는 올리고당이 생성되나 최종적으로는 다량의 젠티오바이오스(DP2)와 글루코스를 생성하는 것을 확인하였다(도 7a 및 7b).

[72] <실시예 7> MALDI-TOF/TOF MS를 사용한 Gly5M 단백질의 효소 반응 특성 확인

[73] Gly5M 단백질의 추가적인 효소 반응 특성 확인을 위해 라미나린, 푸스톨란, 라미나리올리고당을 기질로 2시간동안 반응하여 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Tandem Time Of Flight Mass Spectrometry(MALDI-TOF/TOF MS) 분석을 실시하였다. 분석을 위한 시료는 0.01M NaCl 0.3 μ l, 50% (v/v) 아세토니트릴에 녹인 50 g/L 2,5-디하이드록시벤조산 0.5 μ l와 혼합하여 스테인리스 스틸 타겟 플레이트에 점적하였다. 점적한 시료는 결정 생성을 위해 신속히 건조 후 ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS system(Bruker Daltonics)을 사용하여 분석하였다. 가공하지 않은 MS 데이터는 FlexAnalysis software(version 3.3; Bruker Daltonics)를 통해 가공하였다.

[74] 라미나린을 기질로 하여 반응시킨 경우, Gly5M 단백질에 의해 대부분 글루코스로 전환되었으며 그 외 생산된 DP2부터 DP17에 이르는 다양한 올리고당 중 DP4, DP5가 주로 생산됨을 확인하였다(도 8a).

[75] 푸스톨란을 기질로 사용한 경우, 역시 대부분이 글루코스로 전환됨을 확인하였고 그 외 DP2에서 DP8에 이르는 다양한 올리고당이 생산됨을 확인하였다(도 8b).

[76] 라미나리올리고당(DP2-6)을 기질로 사용한 경우, 특이적으로 기질의 DP 값보다 높은 DP 값을 보이는 피크가 확인되었으며 이를 통해 Gly5M 단백질이 라미나리올리고당(DP2-6)과 반응할 경우 트랜스글리코실화 활성을 보임이 확인되었다(도 9 및 도 10a-c).

[77] <실시예 8> Gly5M 단백질의 유사도 분석 및 계통분류학적 분석

[78] GenBank에서 다른 단백질의 도출된 아미노산 서열을 이용한 유사도 분석에 따르면, Gly5M은 GH5 촉매 도메인 및 CBM6(carbohydrate-binding module 6) 도메인으로 구성된다. β -1,3-글루칸, 대표적으로 라미나린의 가수분해를 위해서는 β -1,3-엔도글루카네이즈(EC3.2.1.39) 및 β -1,3-글루코시데이즈 또는 β -1,3-엑소글루카네이즈(EC3.2.1.58)가 필요하다. GH16, GH17, GH55, GH64, GH81 및 GH128에서 β -1,3-엔도글루카네이즈는 그들의 기질에 적어도 두 개의 인접한 β -1,3-글리코시드 결합을 필요로 한다. 그러나, GH5, GH7, GH12, GH16 및 GH17 패밀리어서 β -1,3-글루코시데이즈 또는

β -1,3-엑소글루카네이즈(EC3.2.1.58)는 β -1,3-글루칸의 비환원성 말단에 작용하여 글루코스를 방출한다. GH5는 가장 큰 GH 패밀리 중 하나이며, 이미 셀룰레이즈 패밀리 A로 알려져 있었다. 현재 5,000개 이상의 GH5 효소의 아미노산 서열을 CAZy 데이터베이스에서 이용할 수 있다. 현재 GH5는 사카로파거스 테그라단스(*S. degradans*) 2-40^T 유래의 19 GH5 효소들을 포함하여 EC 번호를 갖는 21개의 실험적으로 특성이 규명된 효소들을 포함한다(표 3). GH5 효소들은 공유 글리코실-효소 중간체를 포함하여 표준 메카니즘을 공유한다. 따라서, GH5 효소는 가수분해 및 트랜스글리코실화 활성을 둘 다 가지고 있다. 지금까지, β -1,3-엔도글루카네이즈 활성을 나타내는 GH5 계열의 효소는 알려진 바 없다. Gly5M은 GH5에 속하고, GH5 촉매 도메인과 CBM6 도메인으로 이루어져 있다. Gly5M은 CAZy에서 엔도-(1,3 또는 1,4)- β -글루카네이즈인 것으로 예상되었고, 7개의 GH5의 보존된 아미노산 잔기 모두 Gly5M에 존재한다. Gly5M과 유사한 사카로파거스 테그라단스(*S. degradans*) 2-40^T 유래의 Cel5A는 2개의 GH5 촉매 도메인과 3개의 CBM6 도메인으로 이루어져 있다. 그러나, Cel5A의 기질 특이성은 잘 알려져 있지 않다. CBM6 도메인은 탄수화물 결합 모듈로서 기능을 하며, 셀룰레이즈에 널리 존재하나, 어떤 CBM들은 바실러스 할로듀란스(*Bacillus halodurans*) C-125 및 스트렙토마이세스 시오야엔시스(*Streptomyces sioyaensis*) 유래의 라미나리네이즈와 같이 1,3-연결된 글루칸의 비환원 말단을 인식하는 독특한 리간드-결합 표면을 나타내어 라미나린과 결합한다. 사카로파거스 테그라단스(*S. degradans*) 2-40^T 유래의 Gly5L은 GH5 도메인과 CBM6 도메인으로 구성되며, Gly5M과 같이 β -1,3-엔도글루카네이즈 활성을 나타냈다. CBM6는 GH5에서 특성이 규명된 어떠한 β -1,3-엑소글루카네이즈에서도 발견되지 않기 때문에, CBM6는 GH5 효소들에서 β -1,3-엔도글루카네이즈 활성을 부여하는데 중요한 역할을 담당할 것이다. 일반적으로 β -1,3-글루카네이즈의 일반적인 광범위한 특이성은 β -1,3,1,4-글루카네이즈 활성을 통해 β -1,3-1,4-글루칸에 대한 절단 작용이다. 그러나, Gly5M에서는 이러한 촉매 활성은 보이지 않았다. Gly5M은 β -1,3-글루카네이즈 활성뿐만 아니라 β -1,6-글루카네이즈 활성을 보여주어 β -1,3-글루카네이즈의 드문 광범위한 특이성을 보인다. 또한, Gly5M은 라미나린과 비교하여 β -1,6-글루칸, 푸스톨란에 대해 55.6%의 상대 활성을 보였다. Gly5M은 푸스톨란을 효과적으로 가수분해하여 주 산물로 글루코스 및 젠티오바이오스를 생산한다. β -1,6-글리코시드 결합에 대한 Gly5M 활성은 어떠한 β -1,6-글루칸-특이 β -1,6-글루카네이즈보다 훨씬 높았다.

[79] Gly5M 단백질의 계통분류학적 분석을 위해 이전까지 알려진 미생물 유래 β -1,3-엔도글루카네이즈의 유전자 정보를 CAZy database(<http://www.cazy.org>)로부터 획득하여 계통수를 그려보았다.

[80] 도 11에 나타난 바와 같이, 이전에 알려진 다른 β -1,3-엔도글루카네이즈와 계통학적으로 확인한 차이를 확인할 수 있는 GH5에서 보이는 유일한

β -1,3-엔도글루카네이즈이다. GH5 효소들은 53 서브패밀리로 분류하고, Gly5M은 이중 GH5_47로 분류된다. Gly5L은 Gly5M과 44%의 유사도를 나타내며, GH5_47에 속한다. 따라서, GH5_47 효소들은 전체 GH5에 대해 새로운 활성을 나타내는 β -1,3-엔도글루카네이즈로 기능을 수행함을 시사한다.

- [81] 또한, 글리코시드 가수분해효소는 가수분해 활성뿐만 아니라 트랜스글리코실화 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. Gly5M은 도 11에서 β -1,3-올리고당에 대한 트랜스글리코실화 활성을 나타냈다. 글루코스는 기질의 비환원 말단에서 방출되어 기질 자체의 O-3 위치로 전달된다. 따라서, 기질인 라미나리올리고당은 도너 및 수용체로 제공하여 기질보다 더 높은 중합도를 갖는 올리고당을 형성할 수 있다. 이러한 이유로 어떤 β -1,3-1,4-엔도글루카네이즈는 당 수용체에 다른 중합도를 갖는 올리고당을 전달하여 글루칸 합성효소로 작용할 수 있다. β -1,3-엔도글루카네이즈인 유글레나 그라실리스(*Euglena gracilis*) 유래의 EgCel17A는 그러한 트랜스글리코실화를 촉매하나, 궁극적으로 중간체 모두 글루코스, 라미나리바이오스 및 라미나리트리오스로 분해되었다. Gly5M은 고중합도의 β -1,3-글루칸 올리고당의 합성 시 도너 및 수용체 둘 다로서 라미나리올리고당을 인식하는 것으로 보인다. 일반적으로, 올리고당의 효소-촉매된 합성은 어떠한 보호기 없이 명백한 올리고당을 선택적으로 합성하도록 하기 때문에 유용한 방법이다. 따라서, Gly5M은 올리고당-생산 촉매로 이용될 수 있다.
- [82] 결론적으로, Gly5M은 트랜스글리코실화 활성뿐만 아니라 라미나린과 푸스톨란에 대해 β -1,3-1,6-엔도글루카네이즈 작용을 하는 것으로 확인되었다. Gly5M은 새로운 글리코시드 가수분해효소이며, CAZy 데이터베이스에서 GH5에 존재하는 것으로 확인되었다. 연료 또는 기능성 올리고당의 자원으로서 라미나린을 이용하고자 할 때, Gly5M은 글루코스 및 복합 라미나리올리고당의 생산에 적합한 효소로 간주될 수 있다.

[83] [표3]

사카로파커스 데그라단스 (*S. degradans*) 2-40^f 유래의 GH5 효소군

Gene name	GenBank accession no.	Subfamily	EC no. of subfamily	Reference(s)
<i>ce15A</i>	ABD82260.1	GH5_2	3.2.1.4, 3.2.1.32	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>ce15B</i>	ABD81750.1	NC ^a	NA ^b	
<i>ce15C</i>	ABD79589.1	GH5_4	3.2.1.4, 3.2.1.8, 3.2.1.73, 3.2.1.151	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>ce15D</i>	ABD81896.1	GH5_4	3.2.1.4, 3.2.1.8, 3.2.1.73, 3.2.1.151	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>ce15E</i>	ABD82186.1	NC	NA	
<i>ce15F</i>	ABD80834.1	GH5_26	3.2.1.4, 3.2.1.73	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.); Lafond M et al. J Biol Chem 291:7183-7194(2016)
<i>ce15G</i>	ABD82496.1	GH5_2	3.2.1.4, 3.2.1.32	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>ce15H</i>	ABD82494.1	GH5_2	3.2.1.4, 3.2.1.32	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>ce15I</i>	ABD82675.1	GH5_53	3.2.1.74	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>ce15J</i>	ABD81754.1	GH5_2	3.2.1.4, 3.2.1.32	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>gly5K</i>	ABD82250.1	GH5_46	NA	
<i>gly5L</i>	ABD82253.1	GH5_47	3.2.1.39	본 발명
<i>gly5M</i>	ABD82280.1	GH5_47	3.2.1.39	본 발명
<i>man5N</i>	ABD79823.1	GH5_8	3.2.1.78	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>man5O</i>	ABD79918.1	GH5_8	3.2.1.78	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>man5P</i>	ABD79773.1	GH5_7	3.2.1.25, 3.2.1.78	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
<i>man5Q</i>	ABD81801.1	NC	NA	
<i>gly5R</i>	ABD80383.1	NC	NA	
<i>gly5S</i>	ABD81545.1	GH_10	3.2.1.78	Aspeborg H et al., BMC Evol Biol 12:186(2012.)
^a NC, not classified.				
^b NA, not applicable.				

[84]

산업상 이용가능성

[85] 본 발명의 효소는 올리고당 또는 포도당 생산 분야에서 이용할 수 있다.

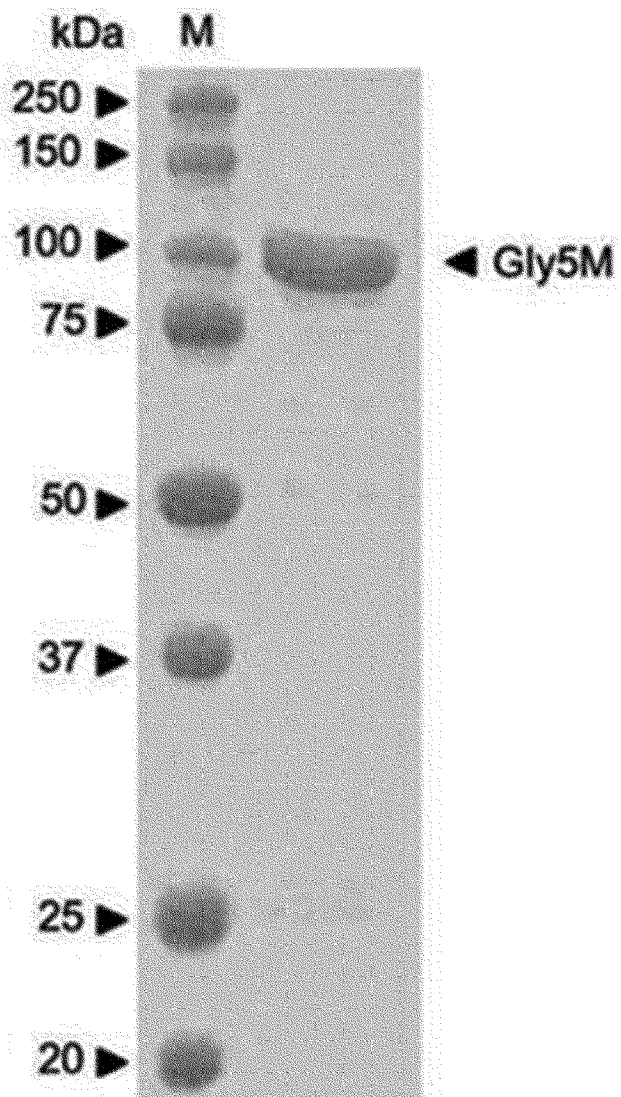
청구범위

- [청구항 1] SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)를 포함하고, 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스툴란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 사용하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 사카로파거스 테그라단스 (*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈는 상기 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 얻은 것인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 유전자는 SEQ ID NO: 2에 기재된 염기서열로 표시되는 것인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 라미나리올리고당은 중합도(degrees of polymerizations) 2 내지 6의 라미나리올리고당 중 어느 하나인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈에 의해 생산되는 올리고당은 라미나리올리고당 또는 젠티오올리고당 중 어느 하나를 포함하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 라미나리올리고당은 중합도 2 내지 17의 라미나리올리고당 중 어느 하나인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 라미나리올리고당은 중합도 2 내지 6의 라미나리올리고당 중 어느 하나를 포함하는, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서, 젠티오올리고당은 중합도 2 내지 8의 젠티오올리고당 중 어느 하나인, 올리고당 또는 글루코스 생산용 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 젠티오올리고당은 젠티오바이오스를 포함하는, 올리고당 또는 글루코스

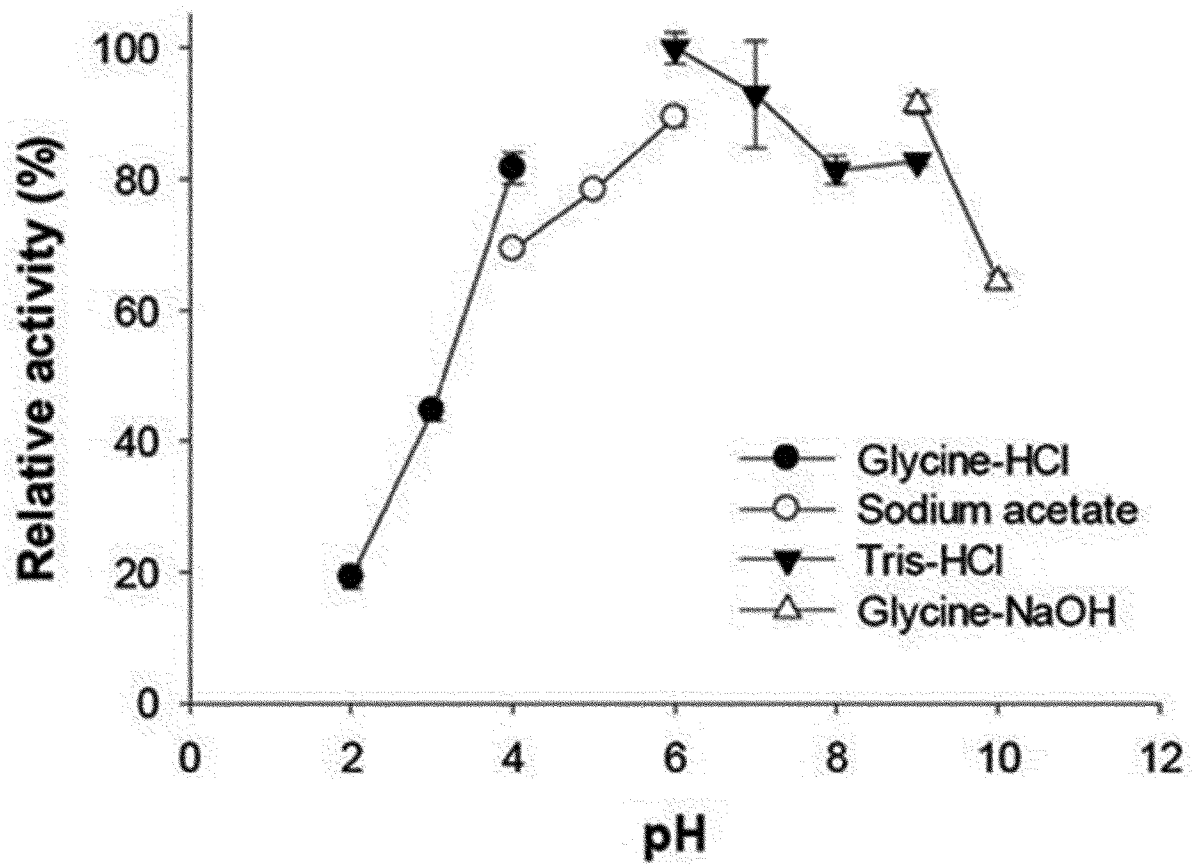
생산용 조성물.

- [청구항 11] SEQ ID NO: 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈(β -1,3-1,6-endoglucanase)와, 기질로, 라미나린(laminarin), 푸스툴란(pustulan) 및 라미나리올리고당(laminarioligosaccharide)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 반응시키는 것을 포함하는 올리고당 또는 글루코스의 생산방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 라미나리올리고당은 중합도 2 내지 6의 라미나리올리고당 중 어느 하나인, 올리고당 또는 글루코스의 생산방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서, 반응은 20 내지 45°C의 온도 범위에서, pH 5 내지 10에서, 5분 내지 1일 동안 수행되는, 올리고당 또는 글루코스의 생산방법.

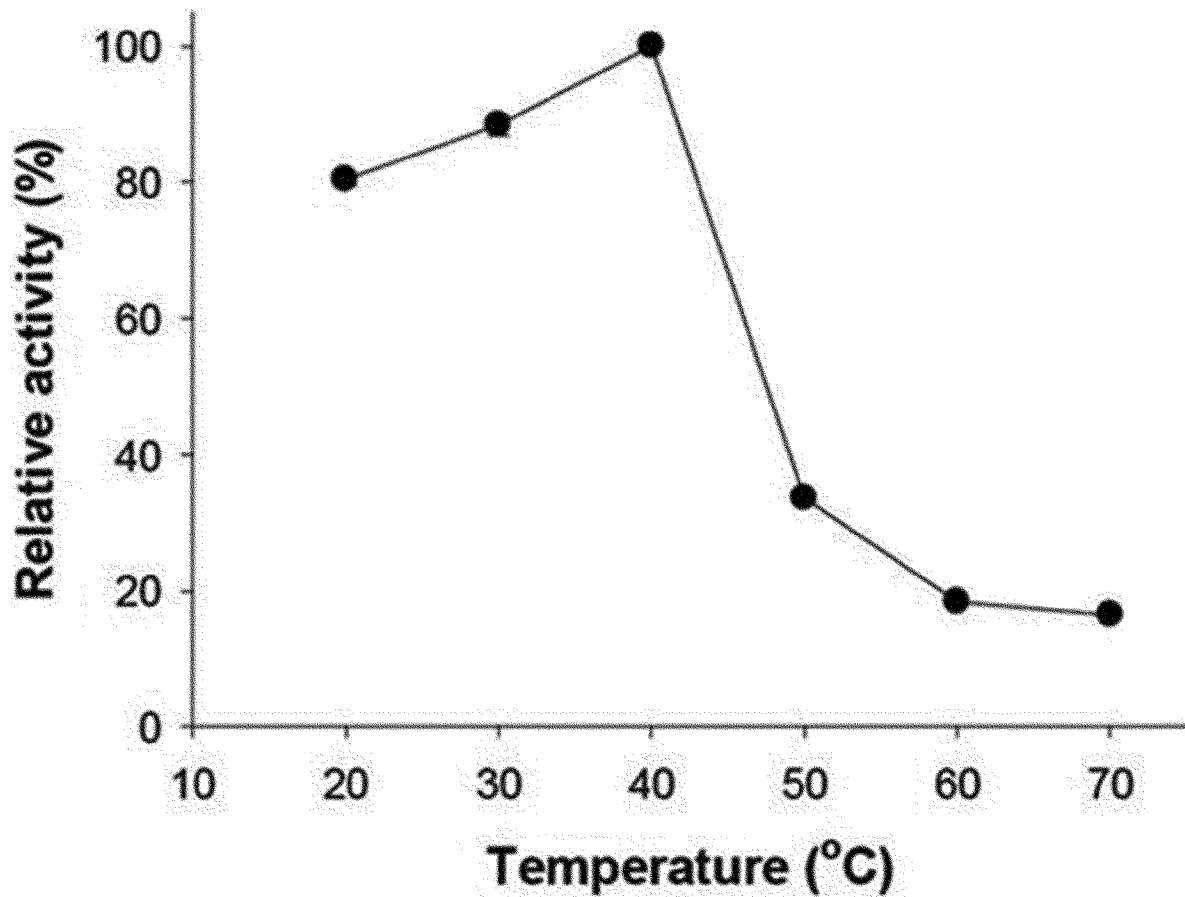
[도1]



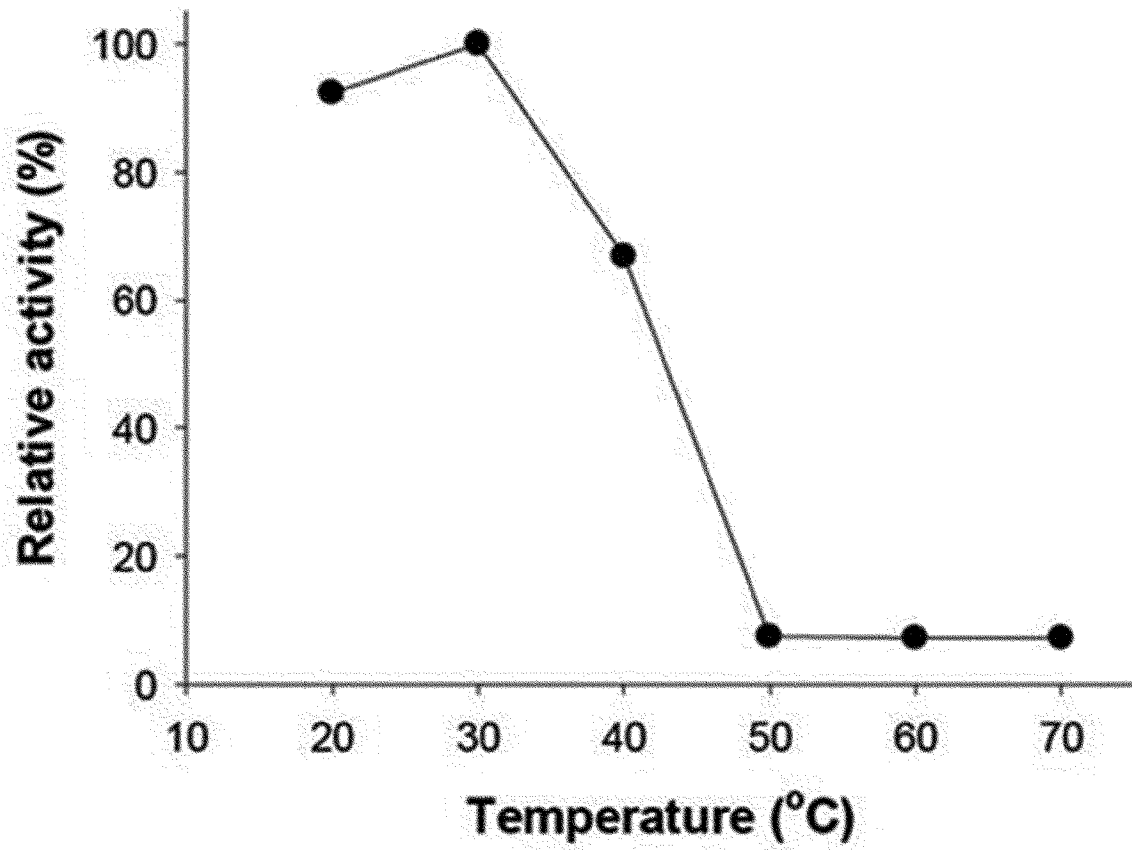
[도2]



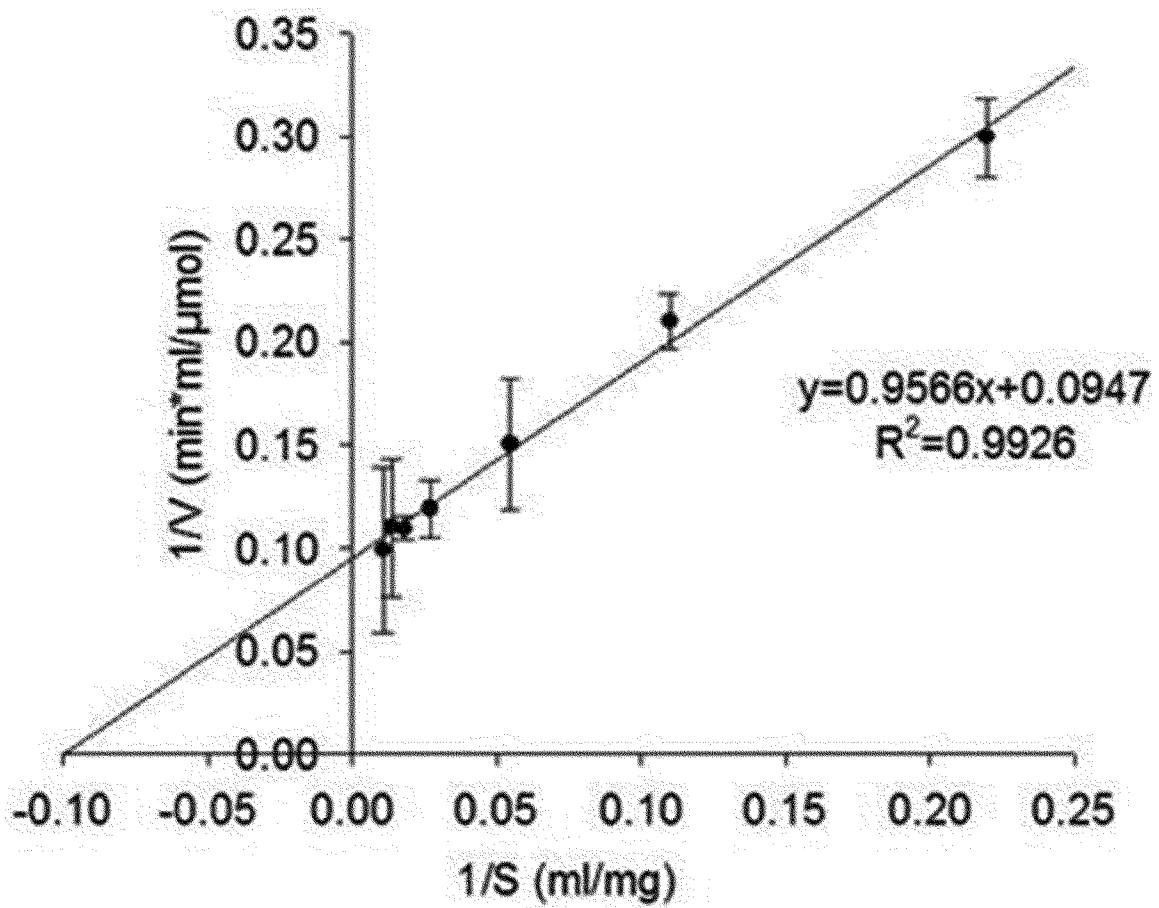
[도3]



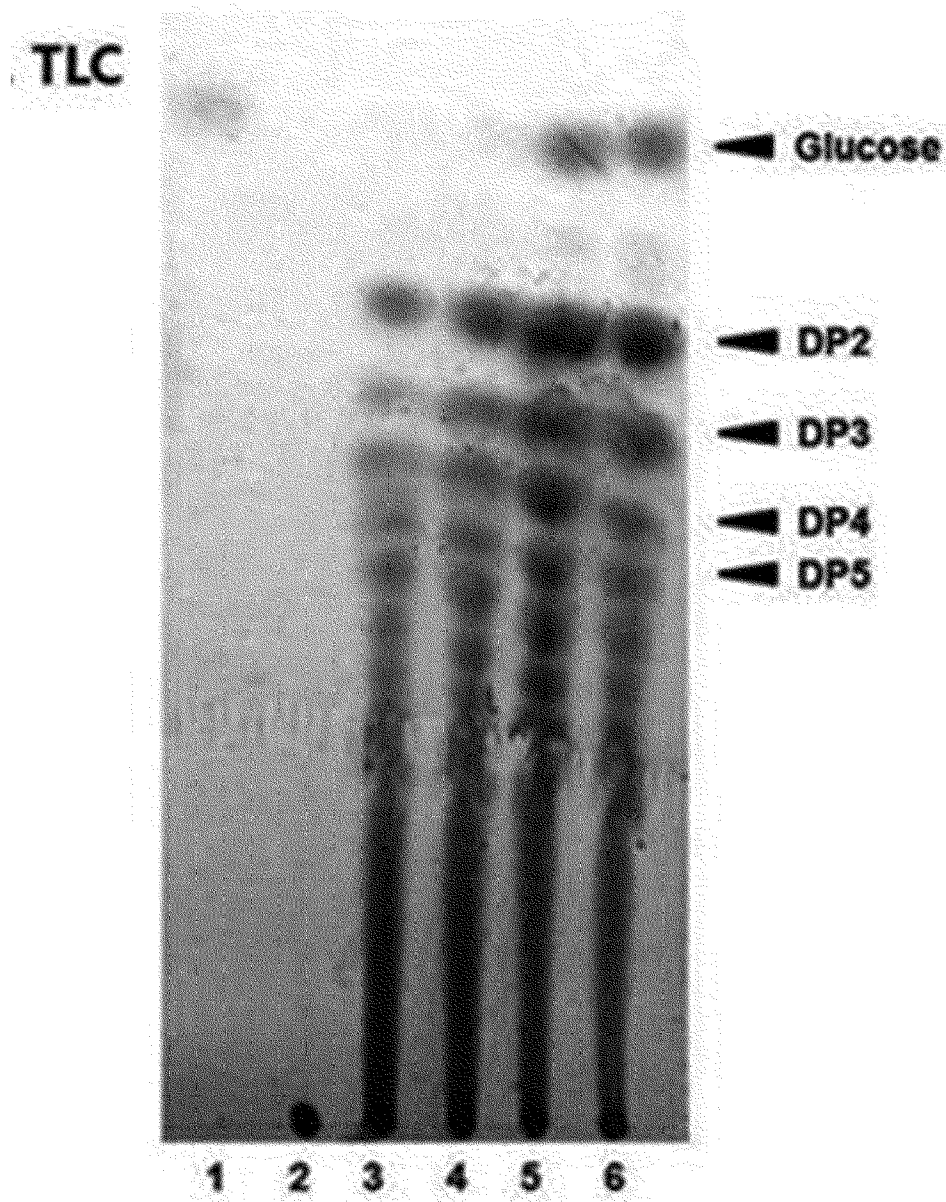
[도4]



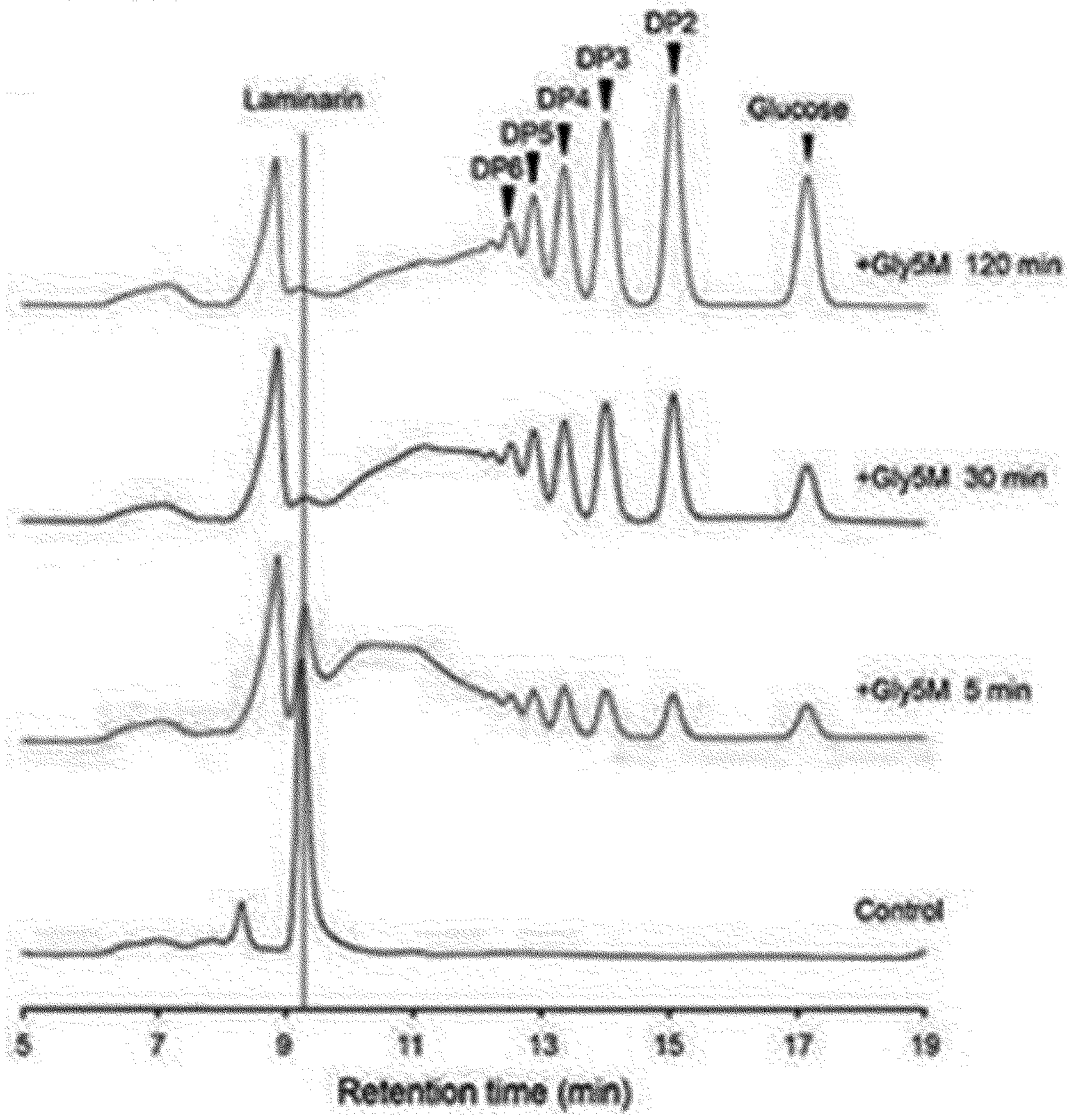
[도5]



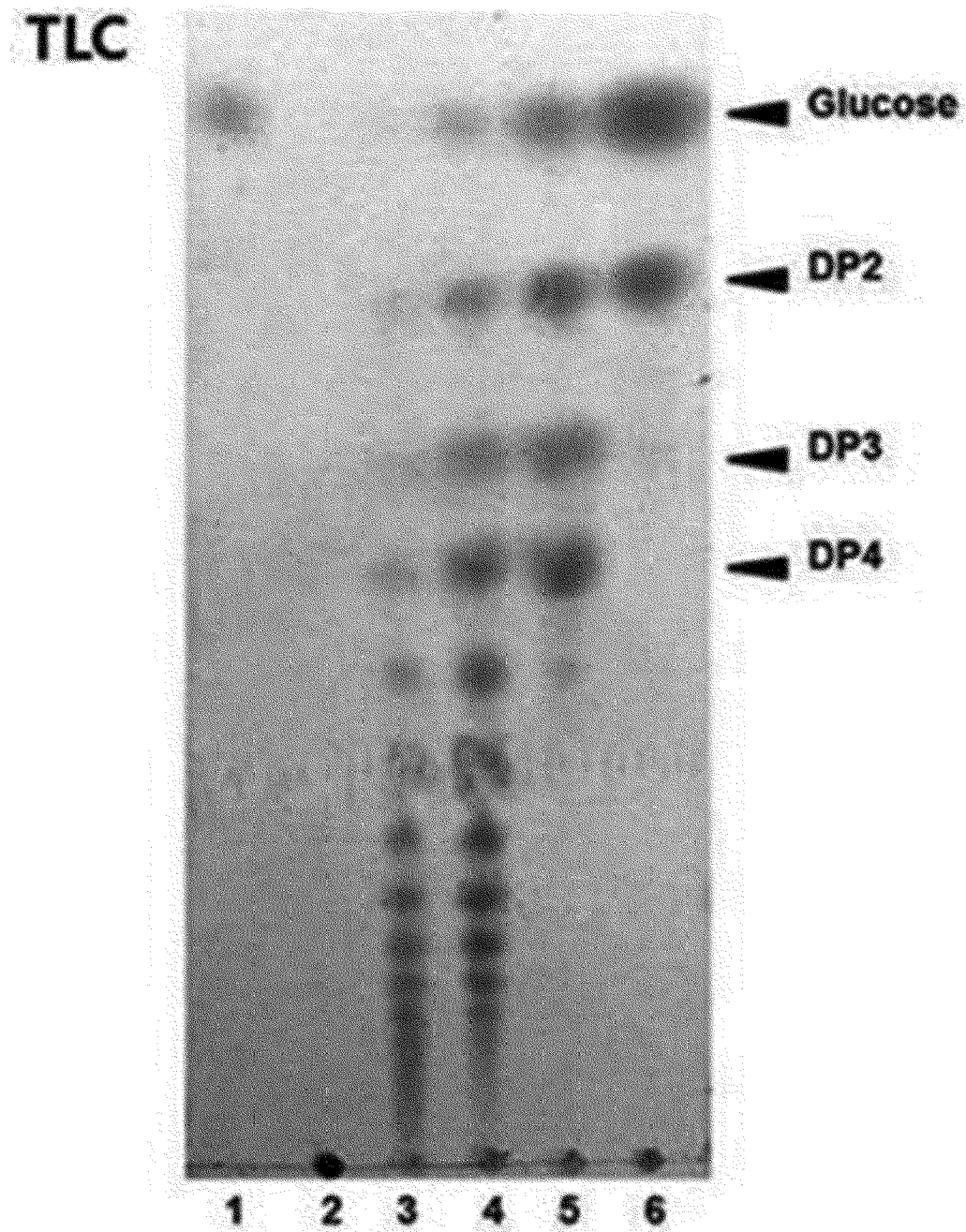
[도6a]



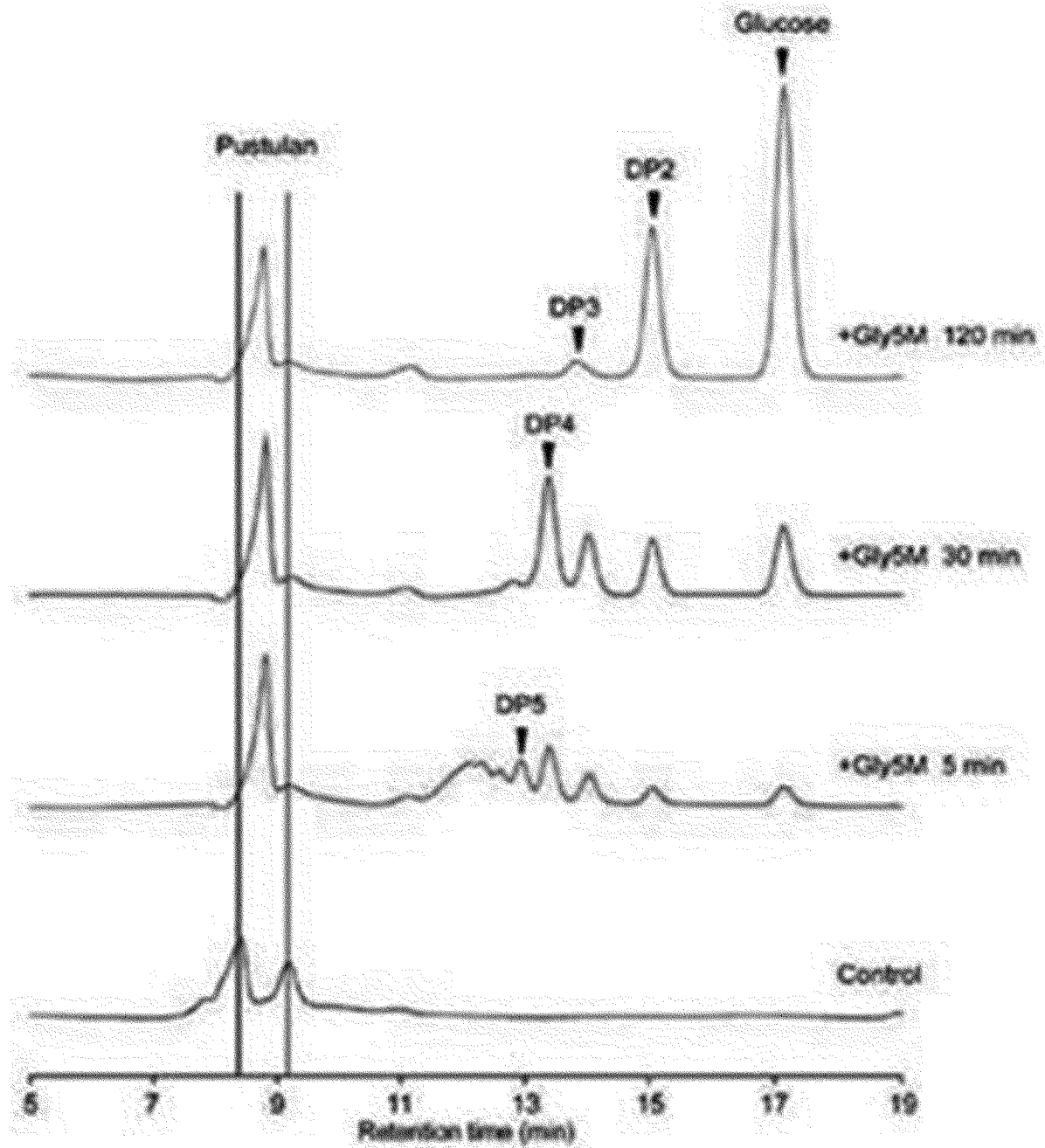
[도6b]

HPLC

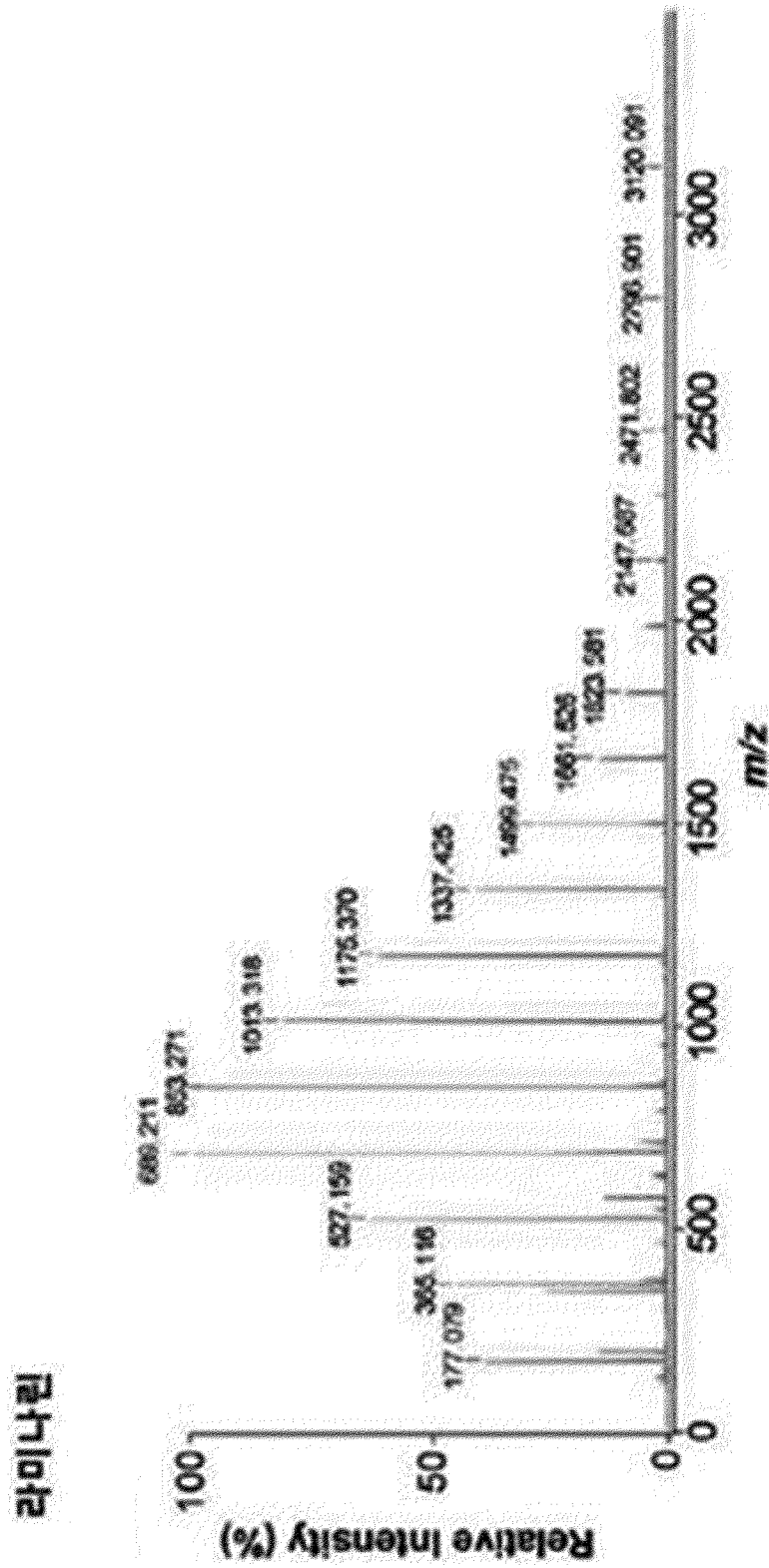
[도7a]



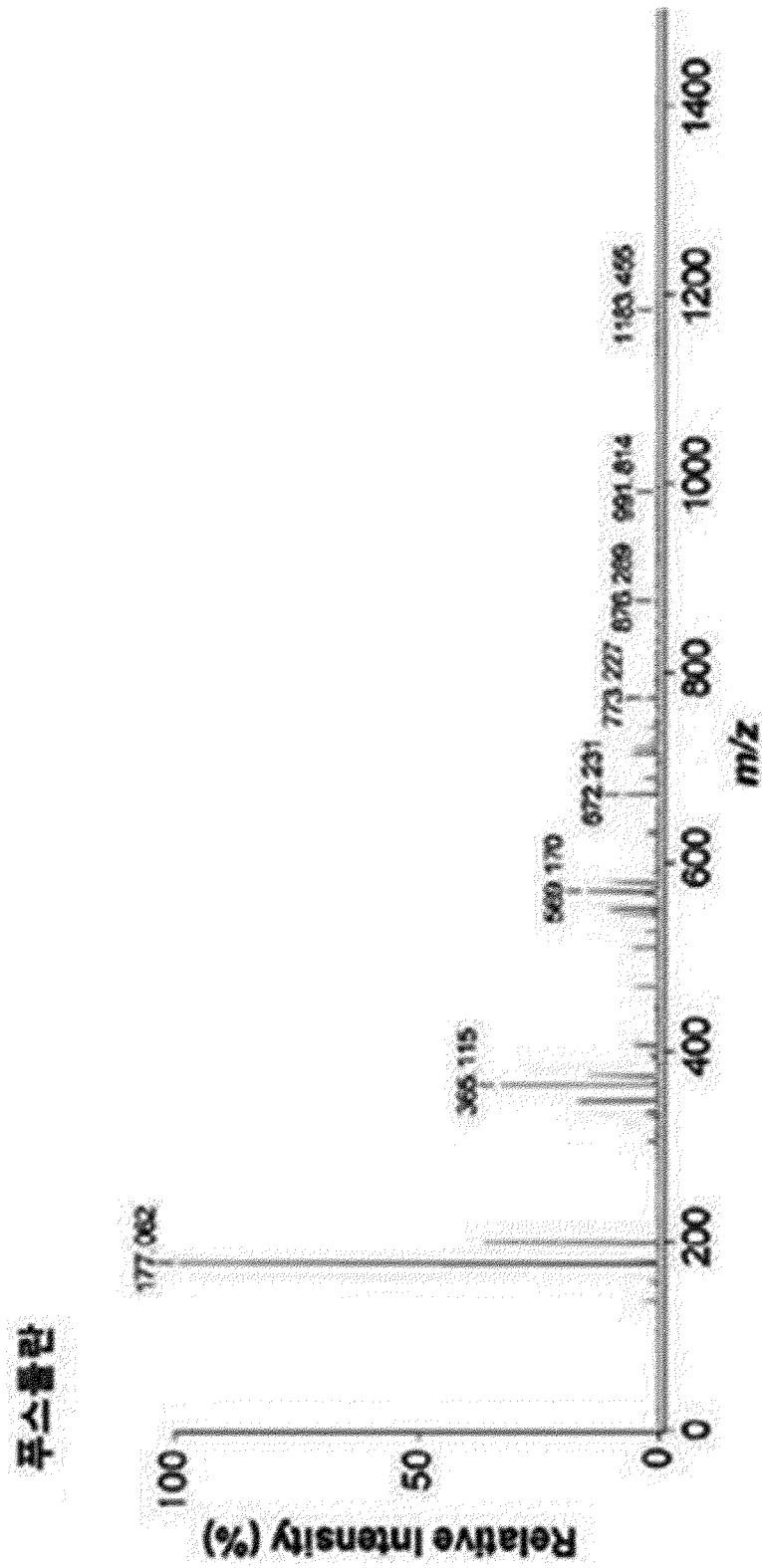
[도7b]

HPLC

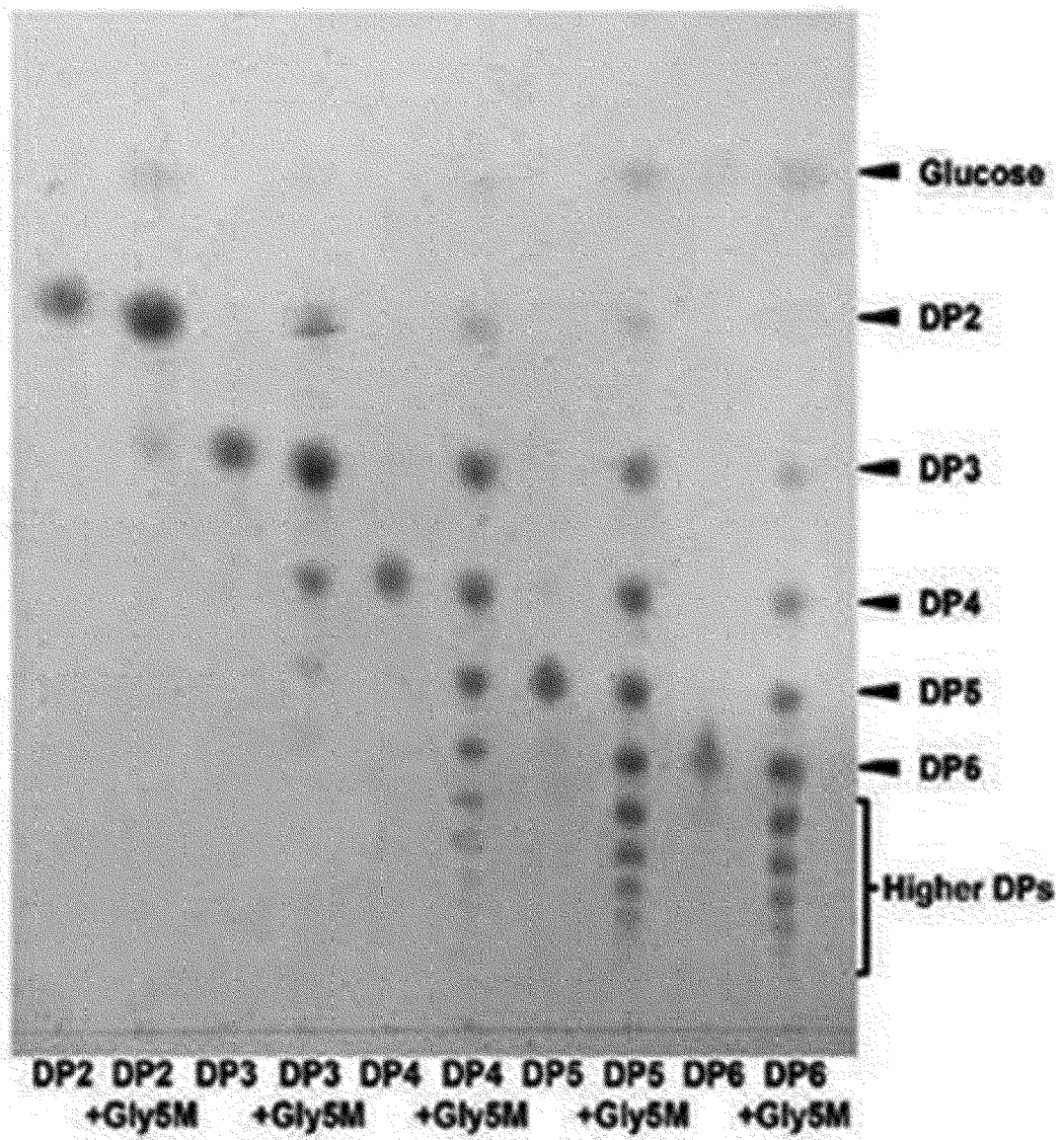
[도8a]



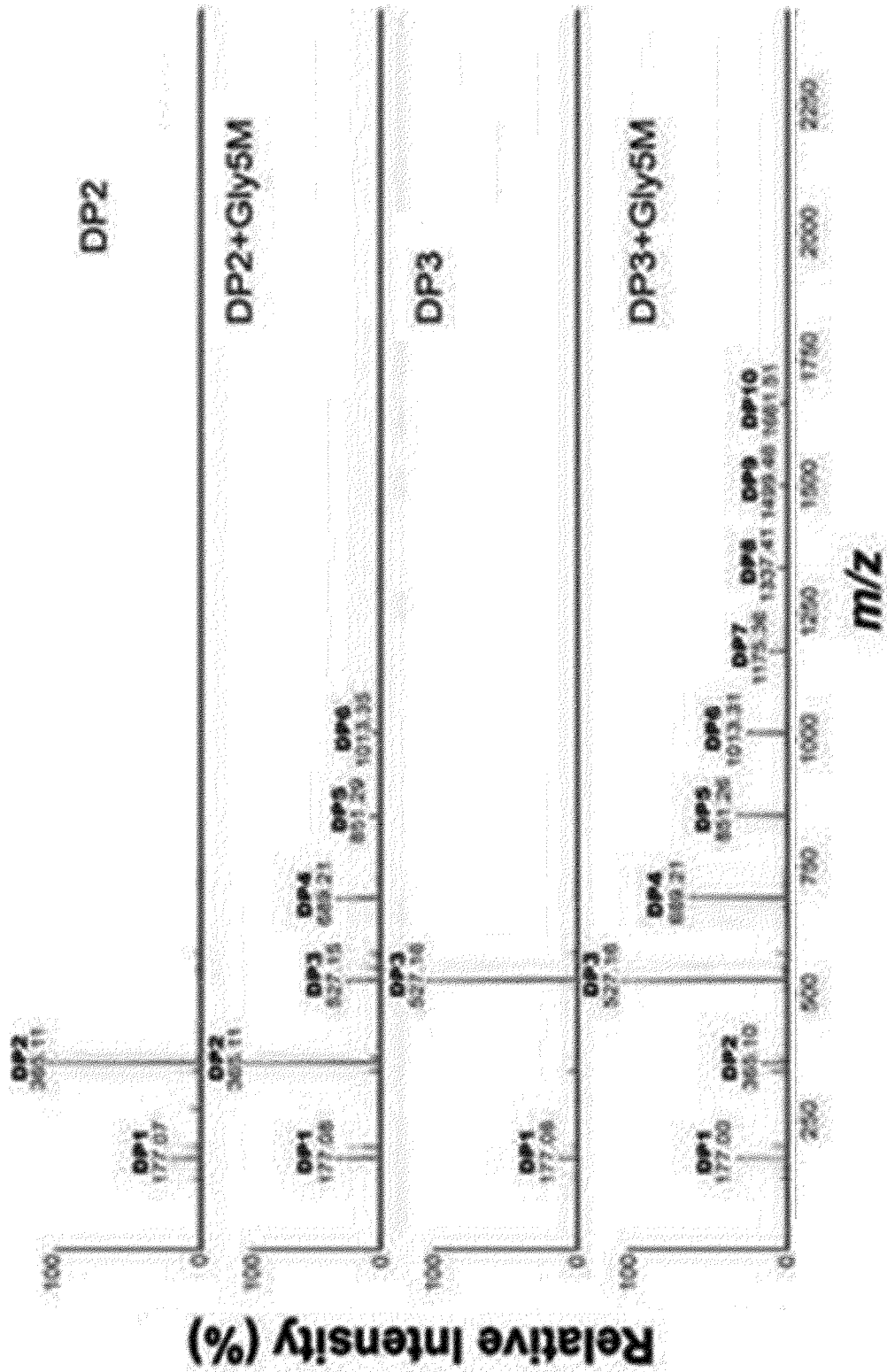
[도8b]



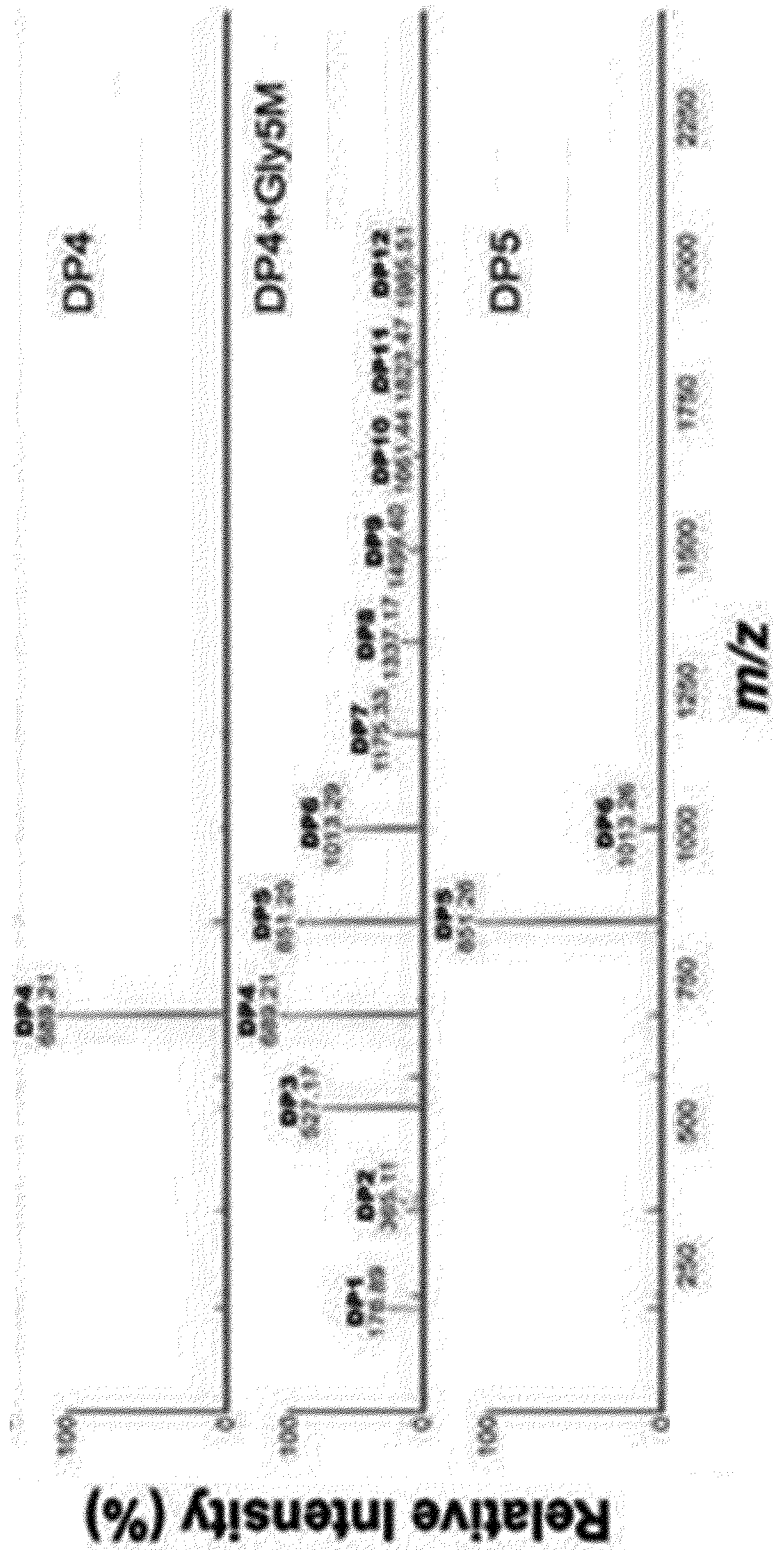
[도9]



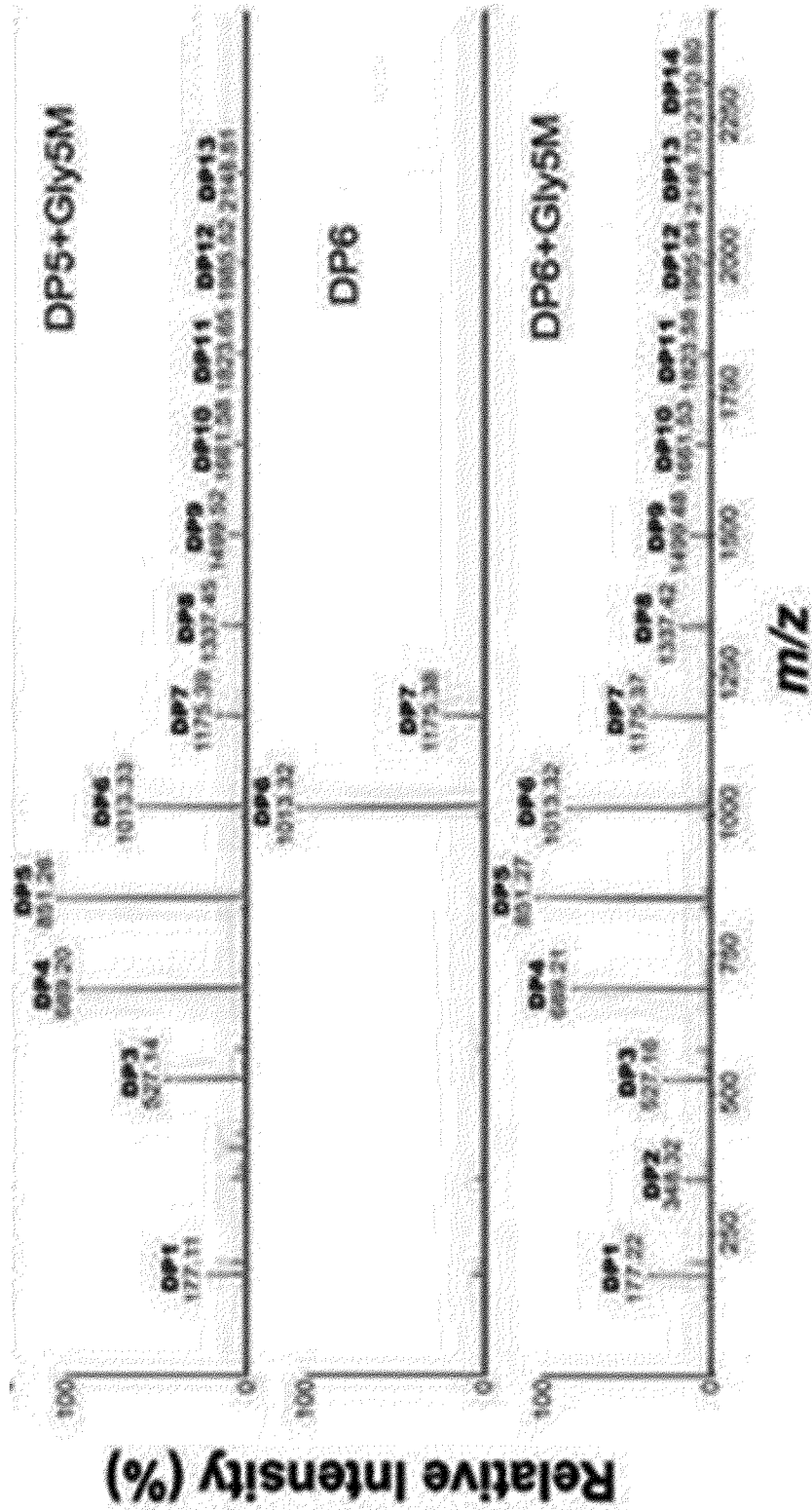
[도 10a]



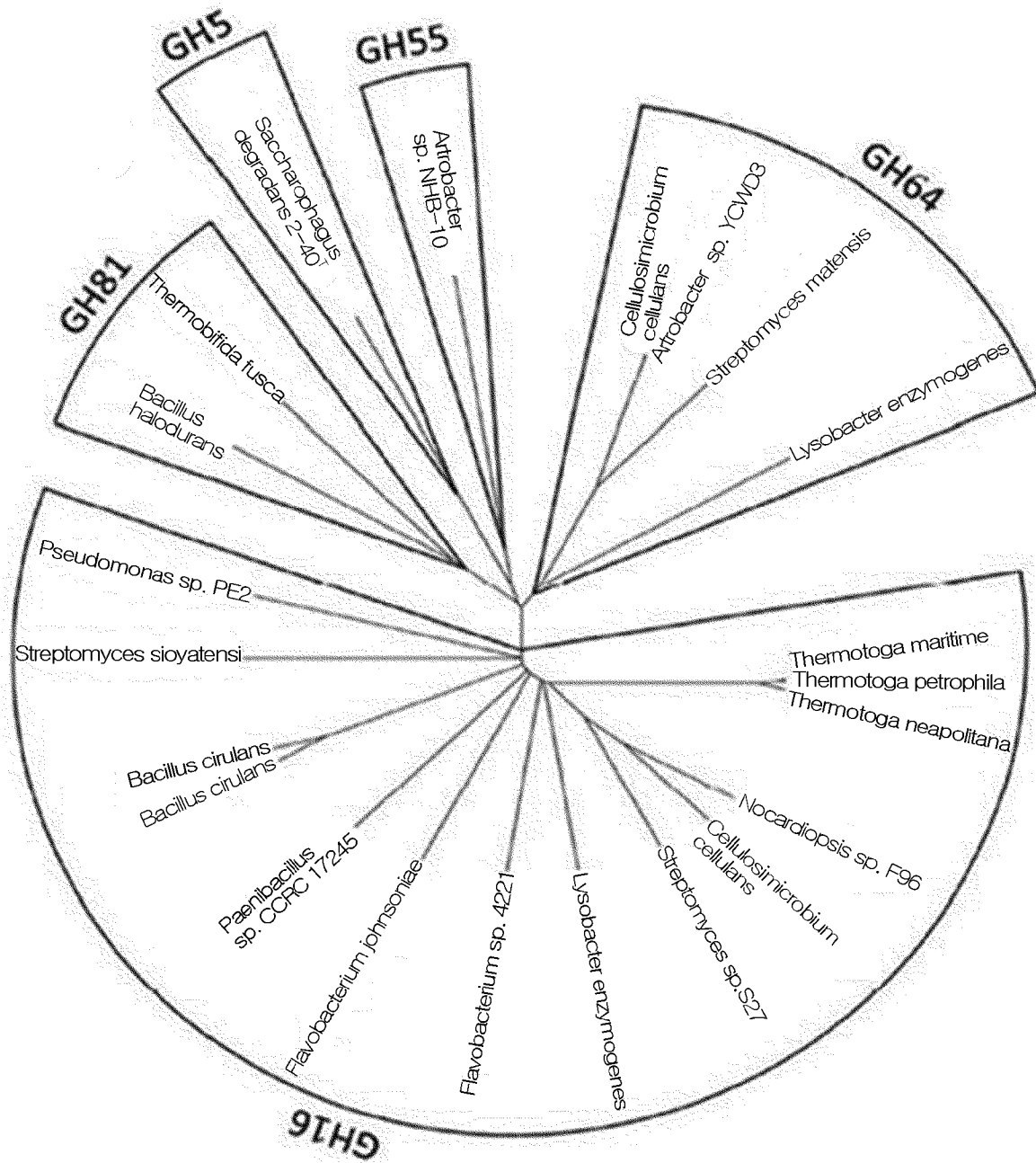
[도10b]



[도10c]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004591

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/04(2006.01)i, C12P 19/20(2006.01)i, C12N 9/24(2006.01)i, C12N 15/52(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 19/04; C12N 15/56; C12N 9/24; C12P 19/20; C12N 15/52

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: beta-1,3-1,6-endoglucanase, laminarin, pustulan, oligosaccharide, glucose

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIOTTO, Lis Schwartz et al., "The Characterization of the Endoglucanase Cell 2A from Gloeophyllum Trabeum Reveals an Enzyme highly Active on β -glucan", PloS One, 24 September 2014, vol. 9, no. 9, e108393 (pages 1-9) See abstract; page 2, left column, second paragraph-fifth paragraph; page 5, left column; figure 3.	1-13
Y	NCBI, GenBank accession no. WP 011469496.1 (11 July 2013) See the entire document.	1-13
Y	SHIMOKAWA, Tomoko et al., "Purification, Molecular Cloning, and Enzymatic Properties of a Family 12 Endoglucanase (EG-11) from Fomitopsis Palustris: Role of EG-II in Larch Holocellulose Hydrolysis", Applied and Environmental Microbiology, September 2008, vol. 74, no. 18, pages 5857-5861 See abstract; page 5859, right column, third paragraph; table 1.	1-13
A	LAFOND, Mickael et al., "Characterization of a Broad-specificity β -glucanase Acting on β -(1, 3)-, β -(1, 4)-, and β -(1, 6)-glucans that Defines a New Glycoside Hydrolase Family", Applied and Environmental Microbiology, December 2012, vol. 78, no. 24, pages 8540-8546 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:	"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
"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 08 AUGUST 2017 (08.08.2017)	Date of mailing of the international search report 08 AUGUST 2017 (08.08.2017)
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004591

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUTCHESON, Steven W. et al., "Carbohydrase Systems of Saccharophagus Degradans Degrading Marine Complex Polysaccharides", Marine Drugs, 21 April 2011 , vol. 9, pages 645-665 See the entire document.	1-13
A	ZVERLOV, Vladimir V. et al., "The Binding Pattern of Two Carbohydrate-binding Modules of Laminarinase Lam16A from Thermotoga Neapolitana: Differences in β -glucan Binding Within Family CBM4", Microbiology, 2001, vol. 147, pages 621-629 See the entire document.	1-13
A	KR 10-1483182 B1 (KOREA INSTITUTE OF OCEAN SCIENCE & TECHNOLOGY) 19 January 2015 See claims 1-4.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004591

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1483182 B1	19/01/2015	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 19/04(2006.01)i, C12P 19/20(2006.01)i, C12N 9/24(2006.01)i, C12N 15/52(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12P 19/04; C12N 15/56; C12N 9/24; C12P 19/20; C12N 15/52

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: 베타-1,3-1,6-엔도글루카네이즈, 라미나린, 푸스톨란, 올리고당, 글루코스

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	MIOTTO, LIS SCHWARTZ 등, 'The characterization of the endoglucanase Cel12A from Gloeophyllum trabeum reveals an enzyme highly active on β -glucan', PloS One, 2014.09.24, 제9권, 제9호, e108393 (1-9 페이지) 초록; 페이지 2, 좌컬럼, 두 번째 단락 - 다섯 번째 단락; 페이지 5, 좌컬럼; 도면 3 참조.	1-13
Y	NCBI, GenBank accession no. WP_011469496.1 (2013.07.11) 전체 문헌 참조.	1-13
Y	SHIMOKAWA, TOMOKO 등, 'Purification, molecular cloning, and enzymatic properties of a family 12 endoglucanase (EG-II) from Fomitopsis palustris: role of EG-II in larch holocellulose hydrolysis', Applied and Environmental Microbiology, 2008.09, 제74권, 제18호, 5857-5861 페이지 초록; 5859 페이지, 우컬럼, 세 번째 단락; 표 1 참조.	1-13
A	LAFOND, MICKAEL 등, 'Characterization of a broad-specificity β -glucanase acting on β -(1, 3)-, β -(1, 4)-, and β -(1, 6)-glucans that defines a new glycoside hydrolase family', Applied and Environmental Microbiology, 2012.12, 제78권, 제24호, 8540-8546 페이지 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

"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 특허 문헌

"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

2017년 08월 08일 (08.08.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 08월 08일 (08.08.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HUTCHESON, STEVEN W. 등, ‘Carbohydrase systems of Saccharophagus degradans degrading marine complex polysaccharides’ , Marine Drugs, 2011.04.21, 제9권, 645-665 페이지 전체 문헌 참조.	1-13
A	ZVERLOV, VLADIMIR V. 등, ‘The binding pattern of two carbohydrate-binding modules of laminarinase Lam16A from Thermotoga neapolitana: differences in β -glucan binding within family CBM4’ , Microbiology, 2001, 제147권, 621-629 페이지 전체 문헌 참조.	1-13
A	KR 10-1483182 B1 (한국해양과학기술원) 2015.01.19 청구항 1-4 참조.	1-13

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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 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:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1483182 B1	2015/01/19	없음	