(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 11 월 26 일 (26.11.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/235946 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 9/24 (2006.01) *C12P 19/14* (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/006649

(22) 국제출원일: 2020 년 5 월 21 일 (21.05.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0059565 2019 년 5 월 21 일 (21.05.2019) 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, Seoul (KR). 김도형 (**KIM, Do Hyoung**); 16881 경기도 용인시 수지구 대지로 137, 107동 1401호, Gyeonggi-do (KR).

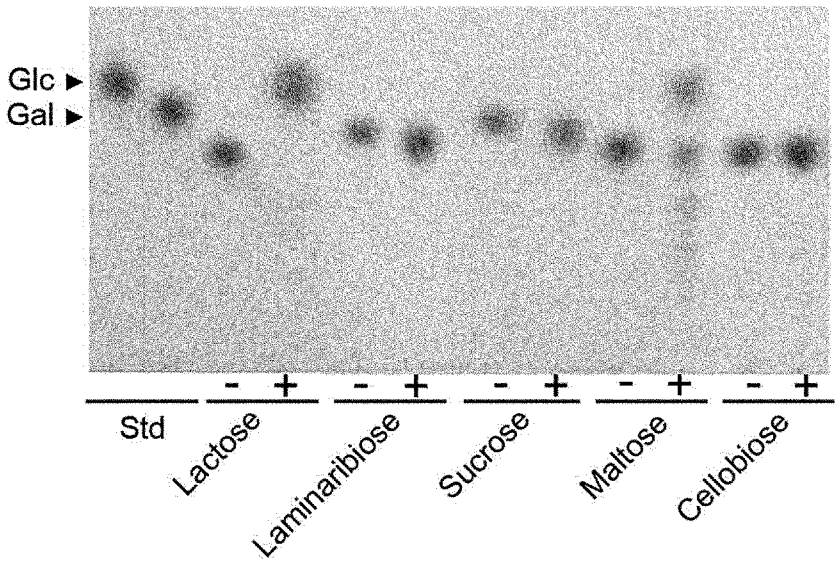
(74) 대리인: 특허법인 다나 (**DANA PATENT LAW FIRM**); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(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, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) **Title:** USE OF ENZYME THAT CLEAVES BOTH ALPHA- AND BETA-1,4-GLYCOSIDIC BONDS

(54) **발명의 명칭:** 알파- 및 베타-1,4-글리코시드 결합을 모두 절단하는 효소의 용도



(57) **Abstract:** The present invention relates to use of an enzyme that cleaves both alpha- and beta-1,4-glycosidic bonds and, more particularly, the present invention provides α-L-fucosidase which has α-1,4-glucosidase and β-1,4-galactosidase activities and thus is capable of producing glucose and/or galactose, which are monosaccharides, from non-fucosylated saccharides. The enzyme has trans-glycosylation activity and thus produces maltooligosaccharides having a higher degree of polymerization than maltooligosaccharides used as a substrate, thereby being applicable to the development of high-value-added new materials in the food industry.

(57) **요약서:** 본 발명은 알파- 및 베타-1,4-글리코시드 결합을 모두 절단하는 효소의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 α-1,4-글루코시데이즈 및 β-1,4-갈락토시데이즈 활성을 가져 비-푸코실화된 당질로부터 단당류인 글루코스 및/또는 갈락토스를 생산할 수 있는 α-L-푸코시데이즈를 제공하며, 상기 효소는 트랜스글리코실화 활성을 가져 기질로 사용되는 말토올리고당보다 높은 중합도를 갖는 말토올리고당을 생산하여 식품 산업에서 고부가가치의 신소재 개발에 적용할 수 있다.

WO 2020/235946 A1

[다음 쪽 계속]

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 알파- 및 베타-1,4-글리코시드 결합을 모두 절단하는 효소의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 알파- 및 베타-1,4-글리코시드 결합을 모두 절단하는 효소의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] α-L-푸코시데이즈(3.2.1.51)는 상이한 유형의 푸코실화된 올리고당 및 푸코글리코컨쥬게이트의 비환원 말단으로부터 α-연결된 L-푸코실 잔기의 가수분해를 촉매할 수 있는 엑소글리코실 가수분해효소이다. 효소가 촉매 작용을 하는 반응의 종류와 기질에 대한 특이성에 따라 푸코시데이즈는 푸코스 및 갈락토스 사이의 α-1,2 결합을 절단하는 α-1,2-L-푸코시데이즈(EC 3.2.1.63), 푸코스 및 N-아세틸글루코사민(GlcNAc) 사이의 α-1,3 결합을 절단하는 α-1,3-푸코시데이즈(3.2.1.111), 및 푸코스와 갈락토스 사이의 α-1,2 결합 및 푸코스와 GlcNAc 사이의 α-1,3/4/6 결합과 같은 다양한 범주의 결합을 절단할 수 있는 특이성이 낮은 α-L-푸코시데이즈(EC 3.2.1.51)로 분류한다. 탄수화물-활성 효소(Carbohydrate-Active EnZymes(CAZy)) 데이터베이스의 분류에 따르면(http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html), α-L-푸코시데이즈는 서로 가수분해 반응 촉매에 사용된 메커니즘이 상이한 GH 패밀리 29(GH29) 및 95(GH95)에 속한다. GH95의 α-L-푸코시데이즈는 특히 직접 치환(반전) 메커니즘을 통해 다양한 올리고당과 당단백질의 당 사슬에서 발견되는 α-1,2 푸코실 결합을 가수분해한다. 반대로, GH29의 α-L-푸코시데이즈에 의해 매개되는 가수분해 반응은 생성된 산물에서 기질 아노머 중심의 배열이 유지되는 곳에서 고전적인 코쉬랜드 이중-치환 메커니즘을 통해 일어난다. 흥미롭게도, GH29의 보유 효소는 가수분해 반응뿐만 아니라 트랜스글리코실화, 즉, 절단된 글리코시드 잔기의 최종 수용체가 물과 다른 하이드록실기-보유 분자인 반응을 촉매할 수 있다. 최근에, GH29는 기질 특이성 및 서열 상동성에 기초하여 두 개의 서브패밀리, GH 서브패밀리 29A 및 29B로 분류하였다. GH 서브패밀리 29A는 α-L-푸코시데이즈를 포함하고, *p*-니트로페닐-α-L-푸코피라노시드(*p*-nitrophenyl-α-L-fucopyranoside; *p*NP-α-L-Fuc)과 같은 합성 기질에 작용할 수 있으며, 푸코실올리고당에 대한 가수분해 능력이 제한적이다. GH 패밀리 29B는 α-L-푸코스데이즈를 포함하고, 비환원성 말단에 분지형 갈락토스 잔기를 갖는 α-1,3/4 푸코실 결합에 대해 보다 위치특이적이며, pNP-α-L-Fuc를 실질적으로 가수분해할 수 없다.

[3] α-L-푸코시데이즈는 세균, 진균, 식물, 해양 무척추동물 및 포유동물을 포함하여 광범위한 생물체에서 분리되었다. 최근에, α-L-푸코시데이즈는

클로닝되어 비피도박테리움(*Bifidobacterium*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 및 락토바실러스(*Lactobacillus*)를 포함하여 몇몇 장내 세균으로부터 특성이 규명되었다. 또한, 일부 장내 미생물에 의한 α-L-푸코시데이즈 및 푸코실 글리칸 분해 사이의 관계가 보고되었다. 현재까지, 모든 보고된 α-L-푸코시데이즈는 올리고당 또는 그들의 컨쥬게이트의 말단 푸코실 결합의 제거를 촉매하나 비-푸코실화된 기질을 가수분해하는 능력은 보고된바 없었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 본 발명의 목적은 이중 글리코시드 가수분해 활성을 갖는 비브리오속(*Vibrio* sp.) 유래의 신규한 푸코시데이즈의 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[5] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 α-L-푸코시데이즈(α-L-fucosidase); 및 락토스 및 중합도(degrees of polymerizations) 2 이상의 말토올리고당으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질을 포함하는 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물을 제공한다.

[6] 본 발명은 또한 단당류 또는 말토올리고당을 생산하기 위한 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 α-L-푸코시데이즈(α-L-fucosidase)의 용도를 제공한다.

[7] 본 발명은 또한 락토스 및 중합도(degrees of polymerizations) 2 이상의 말토올리고당으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질과 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 α-L-푸코시데이즈(α-L-fucosidase)를 반응시키는 단계; 및

[8] 상기 반응의 생성물로부터 단당류 및 기질로 사용되는 말토올리고당 보다 높은 중합도의 말토올리고당을 회수하는 단계를 포함하는 단당류 또는 말토올리고당의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[9] 본 발명의 α-L-푸코시데이즈는 α-1,4-글루코시데이즈 및 β-1,4-갈락토시데이즈 활성을 가져 비-푸코실화된 당질로부터 단당류인 글루코스 및/또는 갈락토스를 생산하며, 상기 효소는 트랜스글리코실화 활성을 가져 기질로 사용되는 말토올리고당보다 높은 중합도를 갖는 말토올리고당을 생산하여 식품 산업에서 고부가가치의 신소재 개발에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[10] 도 1은 SDS-PAGE를 이용한 VeFUC의 발현을 나타낸 것이다. 레인 1은 단백질 마커, 레인 2는 His-tag 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 VeFUC이다.

[11] 도 2는 VeFUC의 효소 활성을 나타낸 것이다. 반응은 기질로 *p*NP-α-L-fuc, *p*NP-α-D-Glc, *p*NP-β-D-Glc, *p*NP-α-D-Gal, *p*NP-β-D-Gal를 이용하여 303K에서 60분 동안 수행되었다. 데이터는 3반복의 평균±표준편차를 나타낸다.

[12] 도 3은 VeFUC의 기질 특이성을 나타낸 것이다. VeFUC를 락토스, 라미나리바이오스, 수크로스, 말토스 및 셀로바이오스를 포함하여 바이오매스-유래 기질과 함께 303K에서 30분 동안 인큐베이션하고 얻은 반응산물의 TLC 분석 결과이다. 글루코스(Glc) 및 갈락토스(Gal)는 반응산물을 위한 마커로 사용되었다(Std, 표준물질; -, 기질 단독; +, 기질과 *Ve*FUC의 반응 결과).

[13] 도 4는 효소 반응을 위한 pH 및 온도의 효과를 나타낸 것이다. 상이한 pH에서 (A) *p*NP-α-L-fuc, (B) 락토스 및 (C) 말토스와 반응한 VeFUC의 상대활성; 상이한 온도에서 (D) *p*NP-α-L-fuc, (E) 락토스 및 (F) 말토스와 반응한 VeFUC의 상대 활성; (G) *p*NP-α-L-fuc, (H) 락토스 및 (I) 말토스를 이용한 VeFUC의 열적 안정성을 결정하기 위해 다른 온도에서 60분 동안 예비-인큐베이션 된 VeFUC의 상대 활성의 측정 결과이다. 데이터는 3반복의 평균±표준편차를 나타낸다.

[14] 도 5는 기질로 락토스(A) 및 말토스(B)를 이용한 VeFUC 효소 반응산물의 TLC(좌측) 및 HPLC(우측) 분석 결과를 나타낸 것이다. 반응은 20 mM Tris-HCl(pH 7.0)에서 313K에서 120분 동안 수행하였다. 글루코스(Glc) 및 갈락토스(Gal)는 반응산물을 위한 마커로 사용하였다(Std, 표준물질; -, 기질 단독; +, 기질과 *Ve*FUC의 반응 결과).

[15] 도 6은 VeFUC의 트랜스글리코실화 활성을 나타낸 것이다. 말토스(DP2), 말토트리오스(DP3) 및 말토테트라오스(DP4)와 VeFUC의 효소 반응산물은 MALDI-TOF/MS에 의해 분석되었다. 반응은 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)에서 313K에서 60분 동안 수행되었다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[16] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[17] 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 α-L-푸코시데이즈(α-L-fucosidase); 및 락토스 및 중합도(degrees of polymerizations) 2 이상의 말토올리고당으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질을 포함하는 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물에 관한 것이다.

[18] 또한, 본 발명은 단당류 또는 말토올리고당을 생산하기 위한 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 α-L-푸코시데이즈(α-L-fucosidase)의 용도를 제공한다.

[19] 본 발명은 또한 락토스 및 중합도(degrees of polymerizations) 2 이상의 말토올리고당으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질과 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 α-L-푸코시데이즈(α-L-fucosidase)를 반응시키는 단계; 및

[20] 상기 반응의 생성물로부터 단당류 및 기질로 사용되는 말토올리고당 보다 높은 중합도의 말토올리고당을 회수하는 단계를 포함하는 단당류 또는

말토올리고당의 생산방법을 제공한다.

[21] 본 발명자들이 해양 세균 비브리오속(*Vibrio* sp.) 균주 EJY3 유래의 α-L-푸코시데이즈, *Ve*FUC를 클로닝하고, 발현시켜 특성을 규명한 결과, α-L-푸코시데이즈는 α-1,4 글루코시데이즈 및 β-1,4 갈락토시데이즈 활성에 의해 비-푸코실화된 기질을 단당류의 글루코스 및/또는 갈락토스로 가수분해할 수 있음을 최초로 보고하였다. 뿐만 아니라, 상기 효소는 트랜스글리코실화 활성을 가지고 있어 기질보다 높은 중합도의 올리고당을 생성할 수 있다.

[22] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 α-L-푸코시데이즈는 합성 기질 또는 천연 이당류에 대한 가수분해 활성을 측정한 결과, 합성 기질, 예컨대, *p*NP-α-L-Fuc, *p*NP-α-D-Glc, *p*NP-β-D-Glc, *p*NP-α-D-Gal, 및 *p*NP-β-D-Gal 중 *p*NP-α-L-Fuc, *p*NP-α-D-Glc, *p*NP-β-D-Gal에 대해 높은 상대 활성을 나타내나, *p*NP-α-D-Gal 및 *p*NP-β-D-Glc에 대해서는 활성을 나타내지 않았다. 또한, 다양한 유형의 글리코시드 결합을 갖는 이당류를 기질로 사용한 경우, 락토스(β-1,4-글리코시드 결합) 및 말토스(α-1,4-글리코시드 결합)는 VeFUC에 의해 가수분해되나, D-글루코스의 2개의 단위로 구성된 α-1,2-글리코시드 결합을 갖는 수크로스, β-1,3-글리코시드 결합을 갖는 라미나리바이오스 및 β-1,4-글리코시드 결합의 셀로바이오스를 가수분해하지 않았다. 따라서, 상기 α-L-푸코시데이즈는 α-푸코시데이즈, α-1,4-글루코시데이즈 및 β-1,4-갈락토시데이즈 활성을 가지나, α-갈락토시데이즈 및 β-글루코시데이즈 활성을 갖지 않음을 알 수 있다.

[23] 상기 결과로부터 본 발명의 α-L-푸코시데이즈는 기질로 비환원 말단의 결합양식으로 β-1,4-글리코시드 결합을 갖는 락토스와 α-1,4-글리코시드 결합을 갖는 말토스를 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[24] 또한, 소듐 아세테이트, Tris-HCl, 글리신-NaOH 등과 같은 완충 용액 내 상기 α-L-푸코시데이즈의 최적 pH는 완충용액의 종류에 따라 달라질 수는 있으나 약 pH 4 내지 8에서 60% 이상의 효소 활성을 나타내고, 구체적으로, 약 pH 6 내지 8에서 가장 높은 활성을 나타낸다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, *p*NP-α-L-Fuc, 말토스 및 락토스에 대한 VeFUC의 가장 높은 활성은 각각 10 mM 소듐 아세테이트 완충액에서 pH6.0, 10 mM Tris-HCl 완충액에서 pH7.0 및 10 mM 소듐 아세테이트 완충액에서 pH6.0에서 얻었다.

[25] 상기 α-L-푸코시데이즈의 효소 활성에 대한 최적 온도는 30 내지 40 ℃이며, 보다 구체적으로 약 30℃이다. 열적 안정성 시험 결과, α-L-푸코시데이즈는 약 30℃ 이하의 온도에서 안정하였으나, 약 30℃ 보다 높은 온도에서 상대 활성은 감소한다. 따라서, 실온에서도 충분히 효소 반응이 가능하므로 온도를 높이기 위한 에너지 소비 없이도 경제적으로 공정을 수행할 수 있는 장점이 있다. 또한, 기존 효소들에 비해 상대적으로 낮은 온도에서의 열처리에도 효소를 불활성화시킬 수 있다.

[26] 상기 α-L-푸코시데이즈는 비브리오속(*Vibrio* sp.) 균주 EJY3 에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[27] 또한, α-L-푸코시데이즈는 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 단당류 또는 말토올리고당의 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.

[28] 상기 α-L-푸코시데이즈는 비브리오속(*Vibrio* sp.) 균주 EJY3 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 비브리오속(*Vibrio* sp.) 균주 EJY3 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.

[29] 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 α-L-푸코시데이즈를 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.

[30] 상술한 바와 같이, 본 발명의 α-L-푸코시데이즈는 락토스 및 말토스를 기질로 사용하여 가수분해 반응을 통해 단당류를 분해산물로 얻을 수 있다. 상기 단당류는 글루코스 및/또는 갈락토스일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 락토스를 기질로 사용하는 경우 글루코스 및 갈락토스가 분해산물로 생성된다. 말토스를 기질로 사용하는 경우 α-글루코시데이즈 및 트랜스글리코실화 활성으로 인해 글루코스와 기질보다 높은 중합도의 말토올리고당이 생성된다.

[31] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 α-L-푸코시데이즈의 트랜스글리코실화 활성을 조사하기 위해, 말토스(DP2), 말토트리오스(DP3), 말토테트라오스(DP)를 기질로 하여 반응시킨 결과, 각 기질에 대해 높은 중합도를 갖는 말토올리고당이 생성되며, 말토스의 경우 글루코스로 가수분해하고, DP3, DP4, DP5의 말토올리고당이 생성된다. 말토트리오스 및 말토테트라오스를 기질로 사용하는 경우 각각 DP8 및 DP9까지의 말토올리고당이 생성된다.

[32] 따라서, 상기 α-L-푸코시데이즈는 락토오스 및 중합도(degrees of polymerizations) 2 이상의 말토올리고당을 기질로 사용할 수 있다. 바람직하게는, 상기 말토올리고당은 중합도 2 내지 4의 말토올리고당일 수 있다. 또한, 기질로 중합도 2 내지 4의 말토올리고당을 사용하는 경우, 분해산물은 기질보다 높은

중합도의 말토올리고당이 생성될 수 있다.

[33] 상기 α-L-푸코시데이즈와 기질의 반응은 30 내지 40 ℃, pH 6 내지 8, 30분 내지 48 시간의 조건에서 반응시켜 생산될 수 있다. 보다 구체적으로, 30 내지 35 ℃, pH 6 내지 8, 30분 내지 2 시간의 조건에서 반응시켜 생산될 수 있다.

[34] 상기 α-L-푸코시데이즈의 분해산물은 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 95%의 고순도의 단당류 또는 말토올리고당을 분리 정제할 수 있다.

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

[36] 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.

[37] 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.

[38] 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.

[39] 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.

[40] 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

[41] <실시예 1> *Ve*FUC 클로닝, 발현 및 특성규명

[42] (*Ve*FUC의 클로닝 및 발현)

[43] *Ve*FUC를 암호화하는 유전자의 클로닝을 위해 비브리오속(*Vibrio* sp.) 균주 EJY3의 게놈 DNA를 다음과 같이 제조하였다: 비브리오속(*Vibrio* sp.) 균주 EJY3를 23 g/L Instant Ocean Sea Salt(Aquarium Systems, Mentor, OH, USA), 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 2 g/L 글루코스, 1 g/L 효모 추출물 및0.5 g/L 암모늄 클로라이드로 구성된 최소 배지에서 303 K 및 200 rpm에서 18시간 동안 배양하였다. 게놈 DNA는 제조업체의 프로토콜에 따라 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 배양물로부터 추출하였다. 표적 유전자, VEJY3_11310(UniProt accession no. H2IHW9.1)는 다음의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다. 밑줄 부분은 BamHI 및 XhoI 제한효소 부위이다;

[44] 5'-GCG GGATCCATGACCAAGCCCACAGCAGGTG-3'(정방향: SEQ ID NO: 3);

[45] 5'-GCG CTCGAG GTGGTGGTGGTGGTGGTGCGCCAAGCGGGGGCCCAACTG-3'(역방향: SEQ ID NO: 4)

[46] 6개의 히스티딘을 암호화하는 서열을 역방향 프라이머에 첨가하여 HisTrap column(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 재조합 단백질을 정제하였다. PCR 산물에 BamHI 및 XhoI 제한효소를 처리하고, 이어서 pET-21a plasmid(Novagen, Darmstadt, Germany)에 라이게이션하여 pET21a- *Ve*FUC 플라스미드를 구축하였다.

[47] (*Ve*FUC의 발현 및 정제)

[48] pET21a- *Ve*FUC 플라스미드가 탑재된 재조합 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)를 310 K 및 200 rpm에서 100 mg L^{-1} 의 앰피실린을 포함하는 Luria-Bertani (LB) 브로스에서 600 nm에서 측정된 배양 브로스의 흡광도가 0.6에 도달할 때까지 성장시켰다. 효소의 과발현은 289 K에서 16시간 동안 1 mM isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside (IPTG)(Sigma, St. Louis, MO)에 의해 유도되었다. 4,000 X g에서 15분 동안 원심분리하여 세포를 회수하고, 초음파로 파괴한 다음, 16,000 X g에서 1시간 동안 원심분리하였다. 무세포 조효소(crude enzyme)는 Ni-nitrilotriacetic acid(NTA) affinity chromatography(Qiagen, Valencia,

CA, USA)를 사용하여 정제하였다. 용출은 300 mM 이미다졸과 함께 1 mL의 용출버퍼로 수행하였다. 정제된 재조합 단백질은 Amicon ultracentrifugal filter unit(molecular weight cutoff value of 50,000, Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 농축하였다. 농축된 효소 용액은 bicinchoninic acid(BCA) 단백질 분석(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 및 12%(w/v) SDS-PAGE 젤 전기영동으로 분석하여 표적 단백질의 농도, 크기 및 순도를 측정하였다.

[49] (*Ve*FUC의 효소 활성 측정)

[50] *Ve*FUC의 효소 활성을 측정하기 위해 4 nmol의 *Ve*FUC를 100 ㎕의 10 mM 합성 기질, 예컨대 *p*-nitrophenyl-α-L-fucopyranoside(*p*NP-α-L-Fuc, α-푸코시데이즈 분석용 기질), *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside(*p*NP-α-D-Glc, α-글루코시데이즈 분석용 기질), *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(*p*NP-β-D-Glc, β-글루코시데이즈 분석용 기질), *p*-nitrophenyl-α-D-galactopyranoside(*p*NP-α-D-Gal, α-갈락토시데이즈 분석용 기질) *p*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(*p* NP-β-D-Gal, β-갈락토시데이즈 분석용 기질) (모두 Sigma-Aldrich에서 구입)과 함께 303 K에서 60분 동안 인큐베이션 하였다. 500㎕의 1M 소듐 카보네이트를 첨가하여 반응을 종결하고, 반응 혼합물의 흡광도는 405 nm에서 분광광도법에 의해 정량하였다. 1 유닛(U)의 *Ve*FUC은 상기 기술된 효소 반응 조건 하에서 1분당 1 μmol의 *p*-nitrophenyl(*p*NP)를 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

[51] 또한, *Ve*FUC의 효소 활성을 시험하기 위해, 수크로스(α-1,2 글리코시드 결합을 갖는 D-글루코스 및 D-프룩토스 단위로 형성됨), 말토스(α-1,4 글리코시드 결합을 갖는 두 개의 D-글루코스로 형성됨)(모두 Sigma에서 구입), 라미나리바이오스(β-1,3 글리코시드 결합으로 두 개의 D-글루코스로 형성됨)(Megazyme, Wicklow, Ireland), 락토스(β-1,4 글리코시드 결합을 갖는 D-갈락토스 및 D-글루코스 단위로 형성됨) 및 셀로바이오스(β-1,4 글리코시드 결합을 갖는 D-글루코스의 두 개의 단위로 형성됨)를 포함하여 바이오매스-유래의 이당류를 시험하였다. 효소 반응을 위해, 4 nmol의 *Ve*FUC를 30 mM의 각 기질을 포함하는 100㎕의 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)와 300 K에서 60분 동안 인큐베이션 하였다.

[52] *p*NP-α-L-Fuc에 대한 *Ve*FUC의 키네틱 파라미터를 측정하기 위해, 상기 기술된 동일한 조건 하에서 0.109 내지 0.875 mM 범위의 *p*NP-α-L-Fuc의 농도 별로 효소 반응을 수행하였다. *Ve*FUC의 효소 키네틱 파라미터, V_{max}, K_m 및 k_{cat} 는 Lineweaver-Burk 플롯으로부터 측정되었다.

[53] (TLC 및 HPLC에 의한 효소 반응산물의 분석)

[54] *Ve*FUC의 효소 반응산물을 분석하기 위해, TLC 및 HPLC를 이용하였다. TLC 분석을 위해, 1㎕의 반응 혼합물을 실리카겔 60 플레이트(Merck, Darmstadt, Germany)에 로딩하였으며, 이때, n-부탄올/아세트산/물(3:2:2의 부피비)로 구성된 이동상을 사용하였고, 에탄올 중 10%(v/v) 황산 용액을 이용하여 403 K에서 5 분

동안 TLC 플레이트를 가열하여 가시화하였다.

[55] 반응산물은 또한 Bio-Rad Aminex HPX-87H 컬럼 및 refractive index detector(Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)가 장착된 Agilent 1100 HPLC system(Agilent)로 분석하였다. HPLC 분석은 이동상으로 5 mM 황산을 이용하여 338 K에서 0.5 mL/min의 유속에서 수행하였다.

[56] (MALDI-TOF MS(matrix-assisted laser desorption ionization-tandem time of flight mass spectrometry)에 의한 효소 반응산물의 분석)

[57] *Ve*FUC의 트랜스글리코실화 활성을 측정하기 위해 4 nmol의 VeFUC를 기질로 30 mM의 말토스, 말토트리오스(α-1,4 글리코시드 결합을 갖는 3개의 D-글루코스 단위로 형성됨), 또는 말토테트라오스(α-1,4 글리코시드 결합을 갖는 4개의 D-글루코스 단위로 형성됨)와 인큐베이션 하였다. 반응 혼합물은 ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS system(Bruker Daltonics)를 이용하여 MALDI-TOF/TOF MS에 의해 분석되었다. 샘플 제조를 위해, 반응산물을 물에 녹이고, 1 ㎕의 가용화된 반응산물을 스테인리스스틸 타겟 플레이트에 점적하고 나서 0.3 ㎕의 10 mM NaCl 및 50%(v/v) 아세토나이트릴 중의 50 g/L의 2,5-디하이드록시벤조산 0.5㎕를 첨가하였다. 스팟은 진공 하에서 빠르게 건조시켜 균일하게 결정화되도록 하였다. 샘플은 앞서 기술한 바와 같이 MALDI-TOF/TOF MS에 의해 분석되었다. 원시 MS 데이터는 FlexAnalysis software(version 3.3; Bruker Daltonics)를 사용하여 가공하였다. 모든 MS 피크는 디컨볼루션하였고, 샘플에서 모든 중성 질량의 리스트가 생성되었으며, 존재비는 질량 스펙트럼 피크 강도로 나타냈다.

[58] (VeFUC 효소의 특성 규명)

[59] VeFUC 활성을 위한 최적 pH를 측정하기 위해, 4 nmol의 VeFUC를 다양한 pH의 완충용액(10 mM 소듐 아세테이트(pH 4.0 내지 6.0), 10 mM Tris-HCl(pH 6.0 내지 9.0) 및 10 mM glycine-NaOH(pH 9.0 내지 10.0))에서 10 mM *p*NP-α-L-Fuc, 10 mM 락토스 및 10 mM 말토스 각각과 303K에서 10분 동안 인큐베이션 하였다.

[60] VeFUC의 효소 활성을 위한 최적 온도를 측정하기 위해, 4 nmol의 VeFUC를 10 mM 소듐 아세테이트(pH 6.0)에서 10 mM *p*NP-α-L-Fuc, 10 mM 락토스 및 10 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에서 각각 10 mM 말토스와 293K 내지 343K의 온도 범위에서 30분 동안 인큐베이션 하였다.

[61] VeFUC의 열적안정성을 측정하기 위해, 4 nmol의 VeFUC를 10 mM 소듐 아세테이트(pH 6.0)에서 10 mM *p*NP-α-L-Fuc, 10 mM 락토스 및 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에서 각각 10 mM 말토스와의 효소 반응 전에 293 K 내지 343 K의 다양한 온도 범위에서 1시간 동안 미리 인큐베이션 하였다. 반응 혼합물을 끓는 물에서 1분 동안 인큐베이션 함으로써 효소 반응을 종결하였다. 반응 혼합물은 HPLC로 분석하였다.

[62] <실험예 1> VeFUC의 효소 활성 및 기질 특이성

[63] 비브리오속(*Vibrio* sp.) 균주 EJY3 유래의 VeFUC, α-L-푸코시데이즈의 효소

활성을 특성규명하였다. 이를 위해, 대장균(*E. coli*) BL21 (DE) 균주에서 VeFUC를 발현시켰으며, VeFUC의 분자량은 그들의 이론적인 질량값, 69.9 kDa에 상응하였다(도 1). 합성 기질, 천연 이당류를 포함하여 기질 별 효소 분석을 수행한 결과, VeFUC는 독특하고 앞서 보고된 바 없는 활성을 나타내는 신규한 α-L-푸코시데이즈로 확인되었다.

[64] VeFUC의 효소 활성을 측정하기 위해, 합성 기질, 예컨대, *p*NP-α-L-Fuc, *p*NP-α-D-Glc, *p*NP-β-D-Glc, *p*NP-α-D-Gal 및 *p*NP-β-D-Gal를 효소 반응에 사용하였다. 이 부류의 화합물은 보통 글리코시데이즈 활성 및 특이성 분석에 사용되었으며, *p*-니트로페닐(*p*-nitrophenyl, *p*NP)기는 훌륭한 이탈기로 작용하며, 분광법에 의해 쉽게 정량화될 수 있다. VeFUC는 *p*NP-α-L-Fuc에 대해 가장 높은 활성을 보여주었으며, 또한, *p*NP-α-D-Glc를 가수분해하여 41.5%의 상대 활성을 나타내고, *p*NP-β-D-Gal에 대해서는 65.3%의 상대 활성을 나타냈다(도 2). 그러나, VeFUC는 *p*NP-α-D-Gal 및 *p*NP-β-D-Glc 에 대해 활성을 나타내지 않았다.

[65] *p*NP-α-L-Fuc에 대한 VeFUC의 키네틱 파라미터를 측정하기 위해, 기질 농도를 달리하여 10 mM 소듐 아세테이트 완충용액(pH 6.0)에서 313 K에서 효소 반응을 수행하였다. VeFUC의 키네틱 파라미터는 Lineweaver-Burk plot를 사용하여 측정하였다. *p*NP-α-L-Fuc에 대한 VeFUC의 V_{max}, K_m, 및 k_{cat} 값은 각각 24.8 ± 0.9 U mg $^{-1}$ protein, 6.34 ± 0.48 mM 및 4.81 ± 1.8 s $^{-1}$이었다. VeFUC에 대한 촉매 상수는 다른 특성이 규명된 세균성 푸코시데이즈의 정상 범위 내에 있었다(표 1).

[66]

[표1]
대표적인 세균성 푸코시데이즈의 키네틱 파라미터

단백질	생물명	기질	Vmax	Km	Kcat	비고
*Ve*FUC	*V. EJY3*	*p*NP-α-L-Fuc	24.8±0.9	6.34±0.48	4.81±1.8	본 발명
BT_2970	*B. thetaiotaomicron*	*p*NP-α-L-Fuc	-	1.5	1.3	Sakurama, H. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012, *76*, 1022-1024.
AlfA	*Lactobacillus casei*	*p*NP-α-L-Fuc	1.14	0.27	-	Rodriguez-Diaz, J. et al. *Appl. Environ.Microbiol*. 2011, *77*, 703-705
AlfB	*L. casei*	*p*NP-α-L-Fuc	6	2.9	-	Rodriguez-Diaz, J. et al. *Appl. Environ.Microbiol*. 2011, *77*, 703-705
AlfC	*L. casei*	*p*NP-α-L-Fuc	22.2	5.3	-	Rodriguez-Diaz, J. et al. *Appl. Environ.Microbiol*. 2011, *77*, 703-705
aLfuk1	*P. thiaminolyticus*	*p*NP-α-L-Fuc	-	0.44±0.02	-	Benesova, E. et al. *Glycobiology*. 2013, *23*, 1052-1065
TM0306	*T. maritima*	*p*NP-α-L-Fuc	-	0.034±0.002	5.4±0.2	Sulzenbacher, G. et al. *J. Biol. Chem*, 2004, *279*, 13119-13128
TfFuc1	*Tannerella forsythia*	*p*NP-α-L-Fuc	20.4±0.8	0.67±0.2	-	Megson, Z. A. et al. *Virulence*, 2015, *6*, 282-292

XCC2888	*Xanthomonas campestris*	*p*NP-α-L-Fuc	-	0.7±0.1	6.1±2.0	Dupoiron, S. et al. *J. Biol. Chem*, 2015, *290*, 6022-6036
Alf1_Wf	*Wenyingzhuangia fucanilytica*	*p*NP-α-L-Fuc	4.75±0.38	3.30±0.42	5.44	Dong, S. et al. *Protein Expr. Purif.*, 2017, *129*, 9-17.

[67] 또한, 다양한 유형의 글리코시드 결합을 갖는 10 mM의 몇몇 이당류와 효소 반응을 수행하였다. 이당류 그룹 중 락토스(β-1,4-글리코시드 결합) 및 말토스(α-1,4-글리코시드 결합)는 VeFUC에 의해 가수분해되었다(도 3). 그러나, VeFUC는 D-글루코스의 2개의 단위로 구성된 α-1,2-글리코시드 결합을 갖는 수크로스, β-1,3-글리코시드 결합을 갖는 라미나리바이오스 및 β-1,4-글리코시드 결합의 셀로바이오스를 가수분해하지 않았다. 이들 결과는 VeFUC가 α-푸코시데이즈, α-1,4-글루코시데이즈 및 β-1,4-갈락토시데이즈 활성을 가지나, α-갈락토시데이즈 및 β-글루코시데이즈 활성을 갖지 않음을 시사한다.

[68] <실험예 2> VeFUC의 특성규명

[69] VeFUC의 효소 활성에 대한 pH 및 온도의 효과를 시험하기 위해, 10 mM *p*NP-α-L-Fuc, 10 mM 락토스 및 10 mM 말토스를 4 nmol의 VeFUC와 다양한 pH(pH 4.0-10.0) 및 온도(293-343 K)에서 인큐베이션 하였다.

[70] *p*NP-α-L-Fuc, 말토스 및 락토스에 대한 VeFUC의 가장 높은 활성은 각각 10 mM 소듐 아세테이트 완충용액에서 pH6.0, 10 mM Tris-HCl 완충용액에서 pH7.0 및 10 mM 소듐 아세테이트 완충용액에서 pH6.0에서 얻었다(도 4a-c). VeFUC 효소 활성에 대한 최적 온도는 모든 기질에 대해 대략 313K가 되는 것으로 측정되었다(도 4d-f). 열적 안정성 시험에서의 결과에 따르면, VeFUC는 60분 동안 예비-인큐베이션 후 303K 이하의 온도에서 안정하였으나, 303K 보다 높은 온도에서 예비-인큐베이션 후에 상대 활성은 감소하였다(도 4g-i).

[71] <실험예 3> VeFUC의 작용 모드

[72] 최적화된 반응 조건에서 락토스 및 말토스와 인큐베이션 된 VeFUC의 반응산물을 TLC 및 HPLC에 의해 분석하였다. 락토스를 기질로 사용하는 경우, 글루코스 및 갈락토스가 생성되었다(도 5a). 이들 결과는 VeFUC가 β-갈락토시데이즈 활성에 의해 락토스의 β-1,4-글리코시드 결합을 가수분해함을 시사한다. 말토스를 기질로 사용하는 경우, α-글루코시데이즈 및 트랜스글리코실화 활성으로 인해 각각 글루코스와 기질보다 높은 중합도가 형성되었다(도 5b). 지금까지, *Ve*FUC는 α-1,4 글루코시데이즈 및 β-1,4 갈락토시데이즈 활성에 의해 푸코실화되지 않은 α- 및 β-글리코시드 결합을 가수분해할 수 있는 이중 촉매 활성을 나타내는 최초의 효소이다.

[73] VeFUC의 트랜스글리코실화 활성을 조사하기 위해, 말토스(DP2), 말토트리오스(DP3) 또는 말토테트라오스(DP4)와 인큐베이션 된 VeFUC의 반응 혼합물을 MALDI-TOF/TOF MS에 의해 분석하였다. 기질로 DP2, DP3 및 DP4를 각각 이용한 모든 반응 혼합물에서 기질보다 높은 중합도를 갖는 올리고당이 검출되었다(도 6). 기질로 말토스를 사용하여 얻은 반응산물은 VeFUC가 일차적으로 말토스를 글루코스(DP1, 176.9 *m/z*)로 가수분해하고 DP5 (DP3, 527.1 *m/z*; DP4, 689.2 *m/z*; DP5, 851.3 *m/z*)까지의 범위에 이르는 올리고당을 형성함을 보여주었다. 말토트리오스 및 말토테트라오스를 기질로 사용하는 경우, VeFUC는 각각 DP8 및 DP9까지의 올리고당을 형성하였다(도 6).

[74] 세균 및 진핵생물에서 발견된 많은 대표적인 GH29 α-L-푸코시데이즈들은 상이한 효율로 트랜스푸코실화 반응을 촉매하는 능력을 가짐을 보여주었다. 지금까지, 대부분의 트랜스푸코실화는 푸코실 도너로 *p*NP-α-L-Fuc를 사용하였다. 흥미롭게도, VeFUC는 α-1,4-올리고당에 대해 높은 트랜스글리코실화 활성을 나타냈다(도 6). 이 결과에 따르면, 기질의 비환원 말단으로부터 방출된 글루코스는 α-1,4 위치선택성을 갖는 기질로 전달된다. 따라서, 기질인 말토스는 도너 및 수용체(자기-축합) 둘 다로서 제공할 수 있어 기질보다 높은 중합도를 갖는 올리고당을 형성할 수 있다. VeFUC의 트랜스글리코실화 활성으로부터 생성된 말토올리고당은 약한 단맛, 상대적으로 낮은 삼투압, 높은 수분-보유 능력 및 적당한 점도, 그리고 결정화를 억제하고 빵의 노화(staling)를 지연시키는 능력으로 인해 식품 산업에서 잠재적 적용이 가능한 고부가가치의 기능성 올리고당이다.

산업상 이용가능성

[75] 본 발명은 높은 중합도를 갖는 말토올리고당을 효율적으로 생산하여 식품 산업에서 고부가가치의 신소재 개발에 적용할 수 있다.

청구범위

[청구항 1] SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는
α-L-푸코시데이즈(α-L-fucosidase); 및
락토스 및 중합도(degrees of polymerizations) 2 이상의 말토올리고당으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질을 포함하는 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
α-L-푸코시데이즈는 α-1,4 글루코시데이즈 및 β-1,4 갈락토시데이즈 활성과 트랜스글리코실화 활성을 갖는, 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
α-L-푸코시데이즈는 비브리오속(*Vibrio* sp.) 균주 EJY3에서 분리한 것인, 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
α-L-푸코시데이즈는 상기 α-L-푸코시데이즈를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 얻은 것인, 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
유전자는 SEQ ID NO: 2의 염기서열을 포함하는, 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
단당류는 글루코스 또는 갈락토스를 포함하는, 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
기질은 중합도 2 내지 4의 말토올리고당을 사용하는, 단당류 또는 말토올리고당 생산용 조성물.

[청구항 8] 락토스 및 중합도(degrees of polymerizations) 2 이상의 말토올리고당으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 기질과 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함하는 α-L-푸코시데이즈(α-L-fucosidase)를 반응시키는 단계; 및
상기 반응의 생성물로부터 단당류 및 기질로 사용되는 말토올리고당 보다 높은 중합도의 말토올리고당을 회수하는 단계를 포함하는 단당류 또는 말토올리고당의 생산방법.

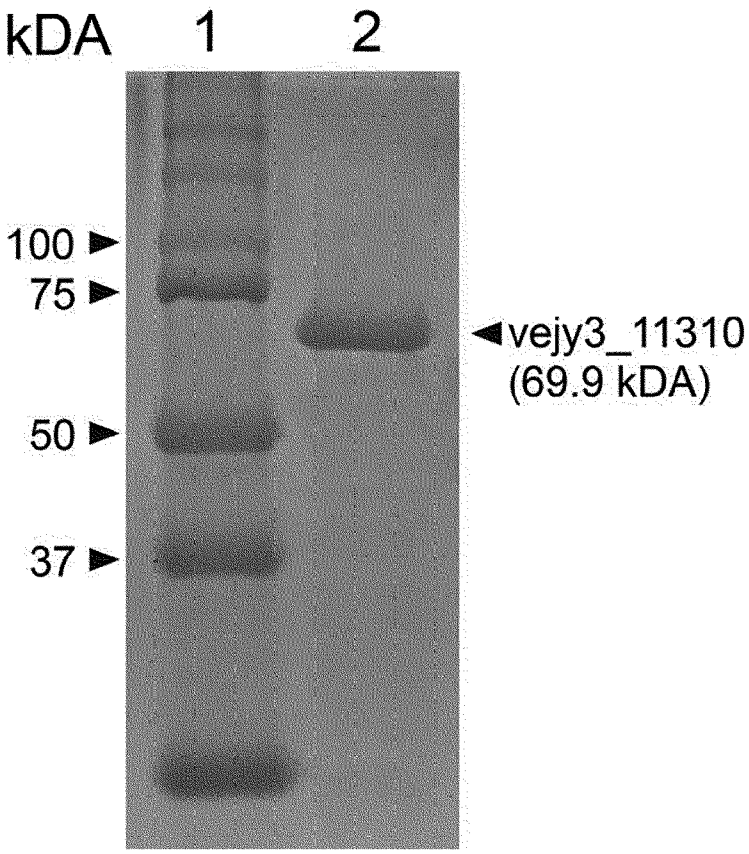
[청구항 9] 제8항에 있어서,
반응은 30 내지 40 ℃, pH 6 내지 8, 30분 내지 48 시간의 조건에서 수행하는, 단당류 또는 말토올리고당의 생산방법.

[청구항 10] 제8항에 있어서,

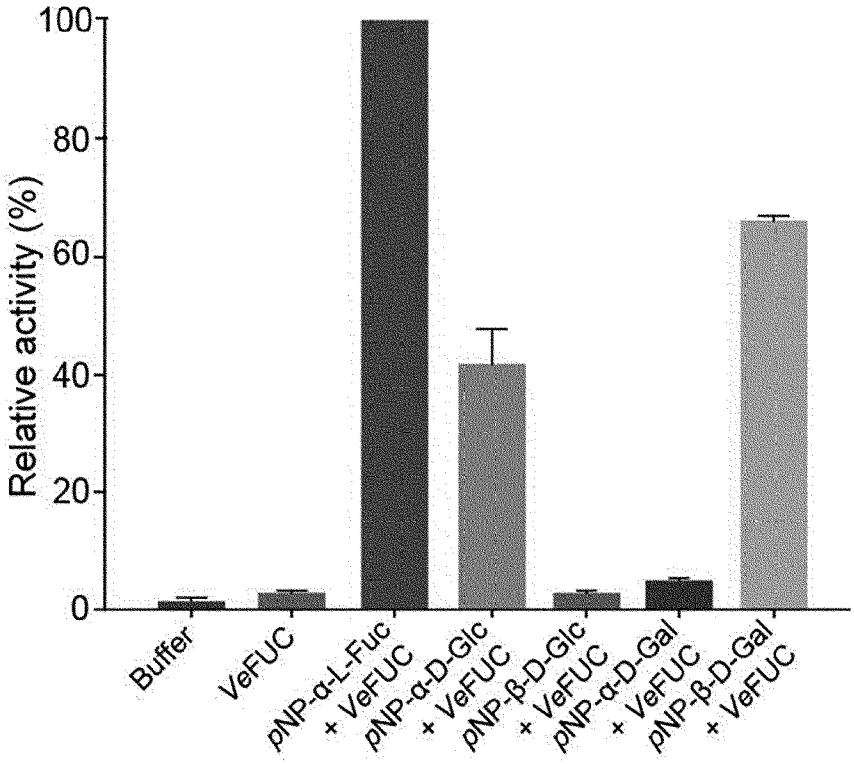
기질은 중합도 2 내지 4의 말토올리고당을 사용하는, 단당류 또는 말토올리고당의 생산방법.

[청구항 11] 제8항에 있어서,
단당류는 글루코스 또는 갈락토스를 포함하는, 단당류 또는 말토올리고당의 생산방법.

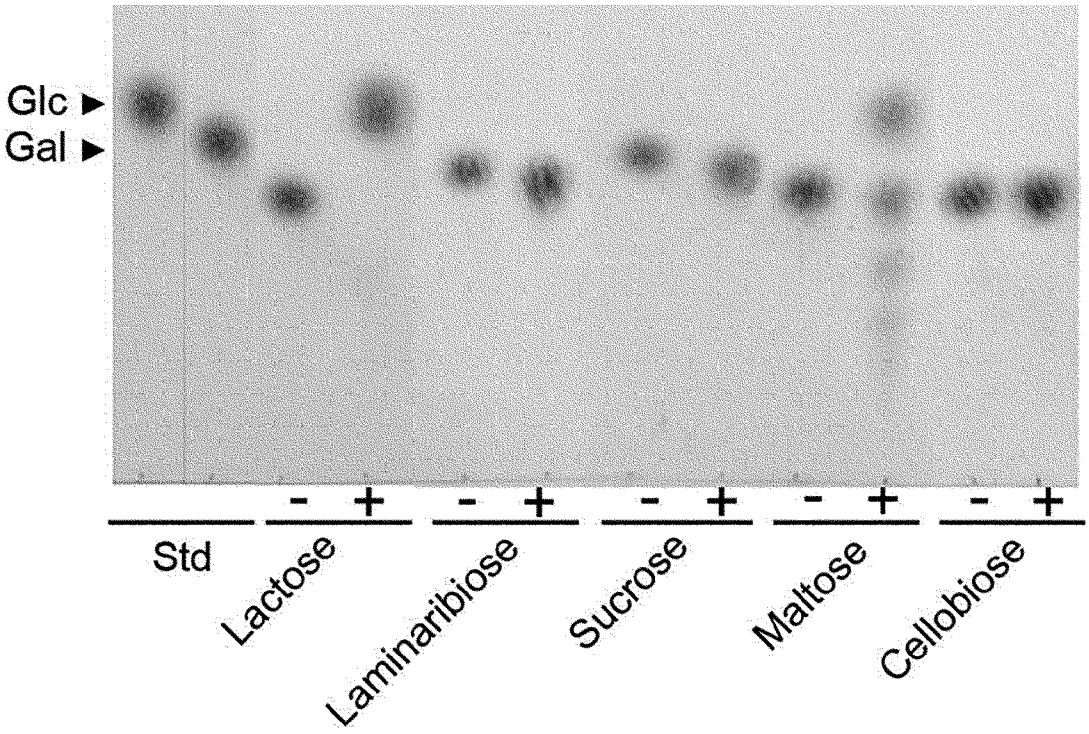
[도1]


kDA
1
2
100
75
50
37
vejy3_11310
(69.9 kDA)

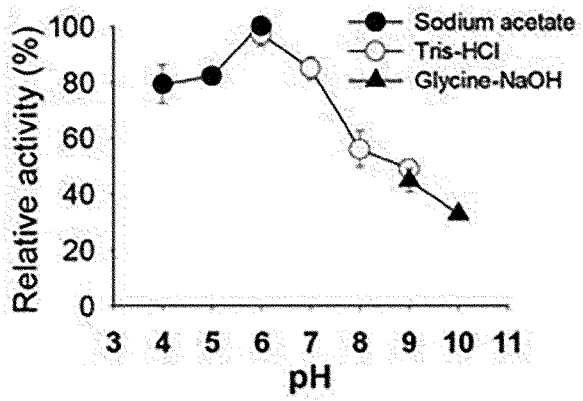
[도2]


Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
Buffer
VeFUC
pNP-α-L-Fuc + VeFUC
pNP-α-D-Glc + VeFUC
pNP-β-D-Glc + VeFUC
pNP-α-D-Gal + VeFUC
pNP-β-D-Gal + VeFUC

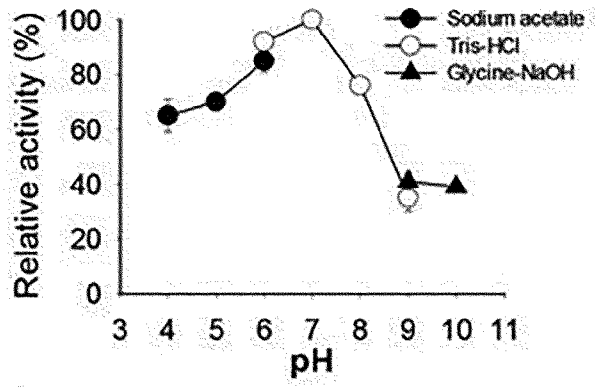
[도3]


Glc ▶
Gal ▶
- + - + - + - + - +
Std
Lactose
Laminaribiose
Sucrose
Maltose
Cellobiose

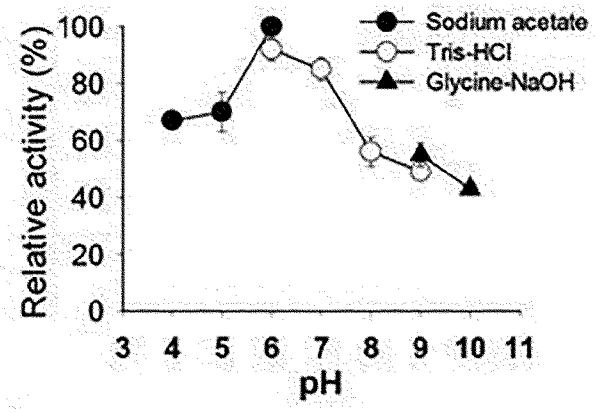
[도4a]


Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
3 4 5 6 7 8 9 10 11
pH
Sodium acetate
Tris-HCl
Glycine-NaOH

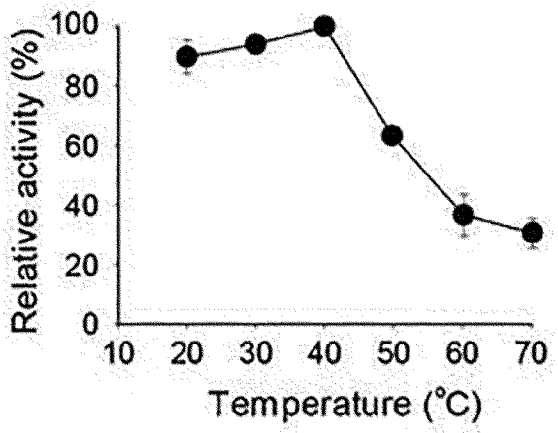
[도4b]


Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
3 4 5 6 7 8 9 10 11
pH
Sodium acetate
Tris-HCl
Glycine-NaOH

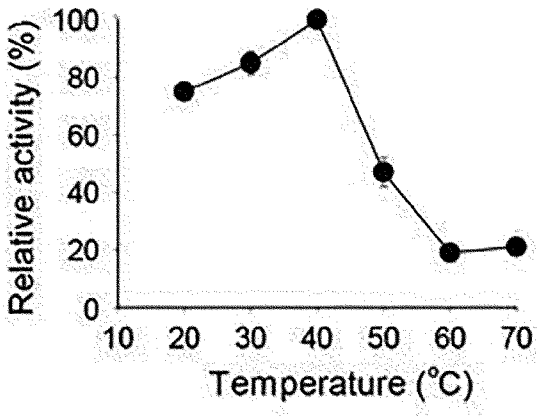
[도4c]


Sodium acetate
Tris-HCl
Glycine-NaOH
Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
3 4 5 6 7 8 9 10 11
pH

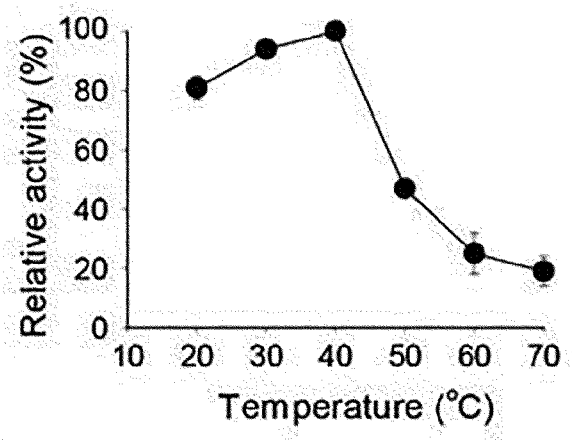
[도4d]


Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
10 20 30 40 50 60 70
Temperature (°C)

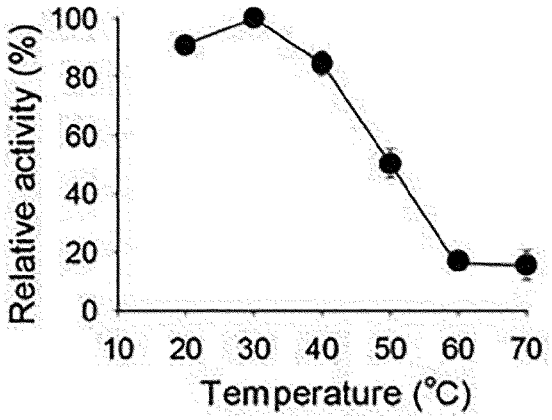
[도4e]


Relative activity (%)
100
80
60
40
20
0
10 20 30 40 50 60 70
Temperature (°C)

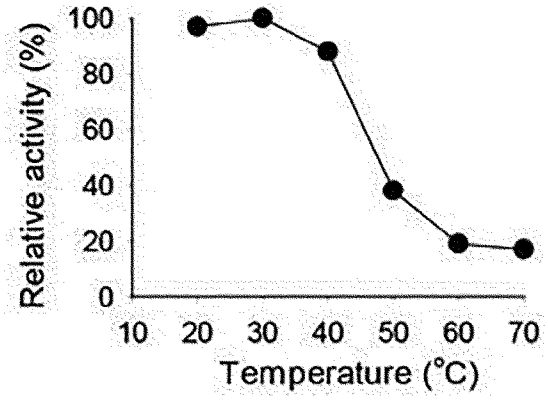
[도4f]



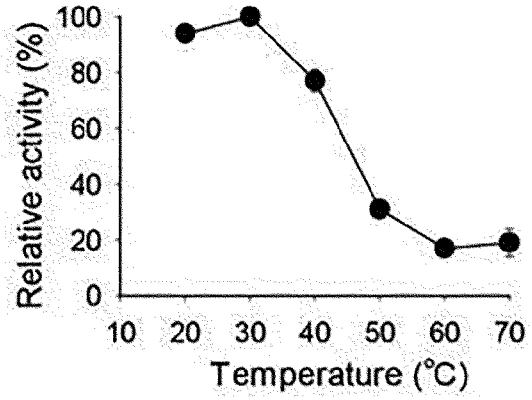
[도4g]



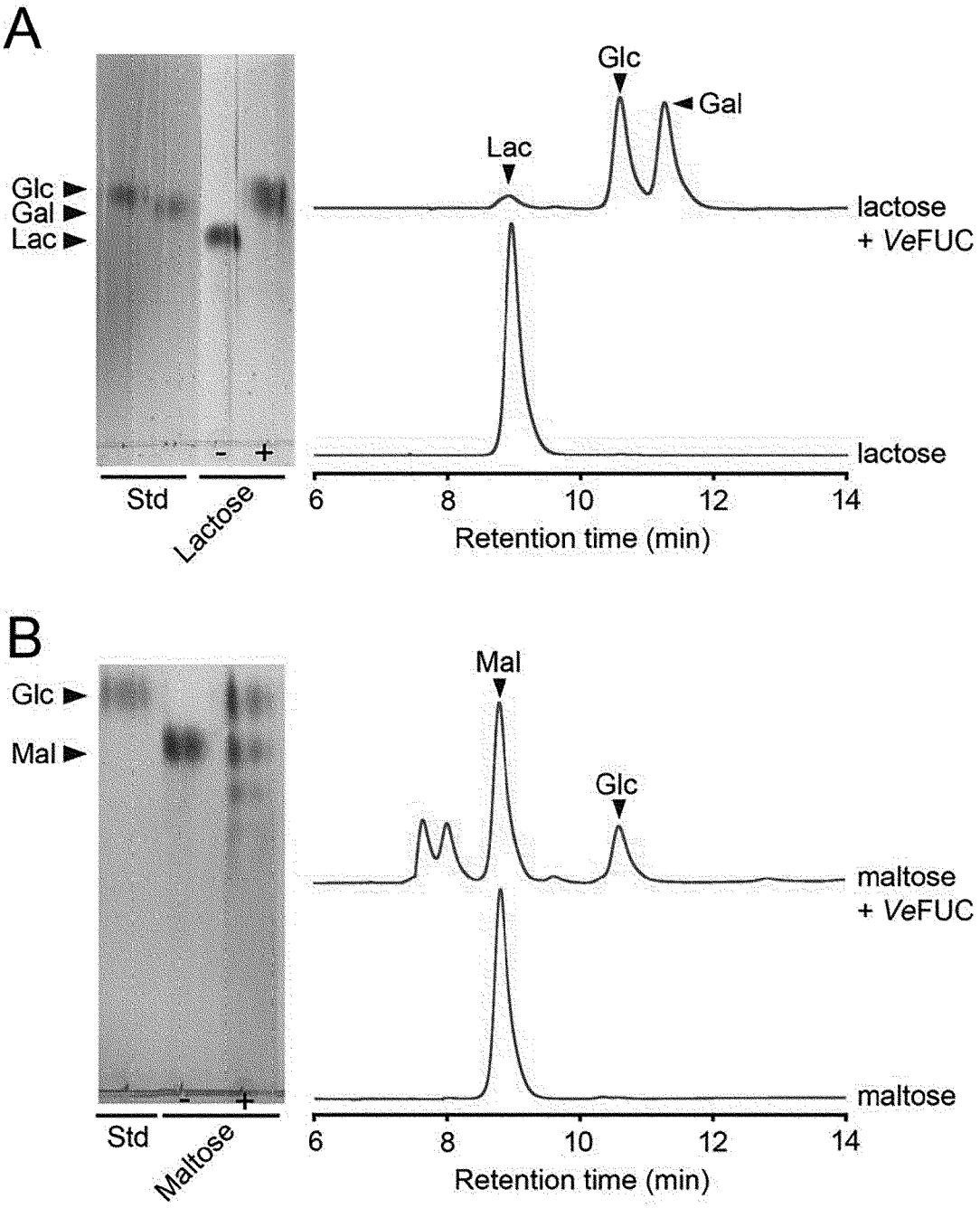
[도4h]



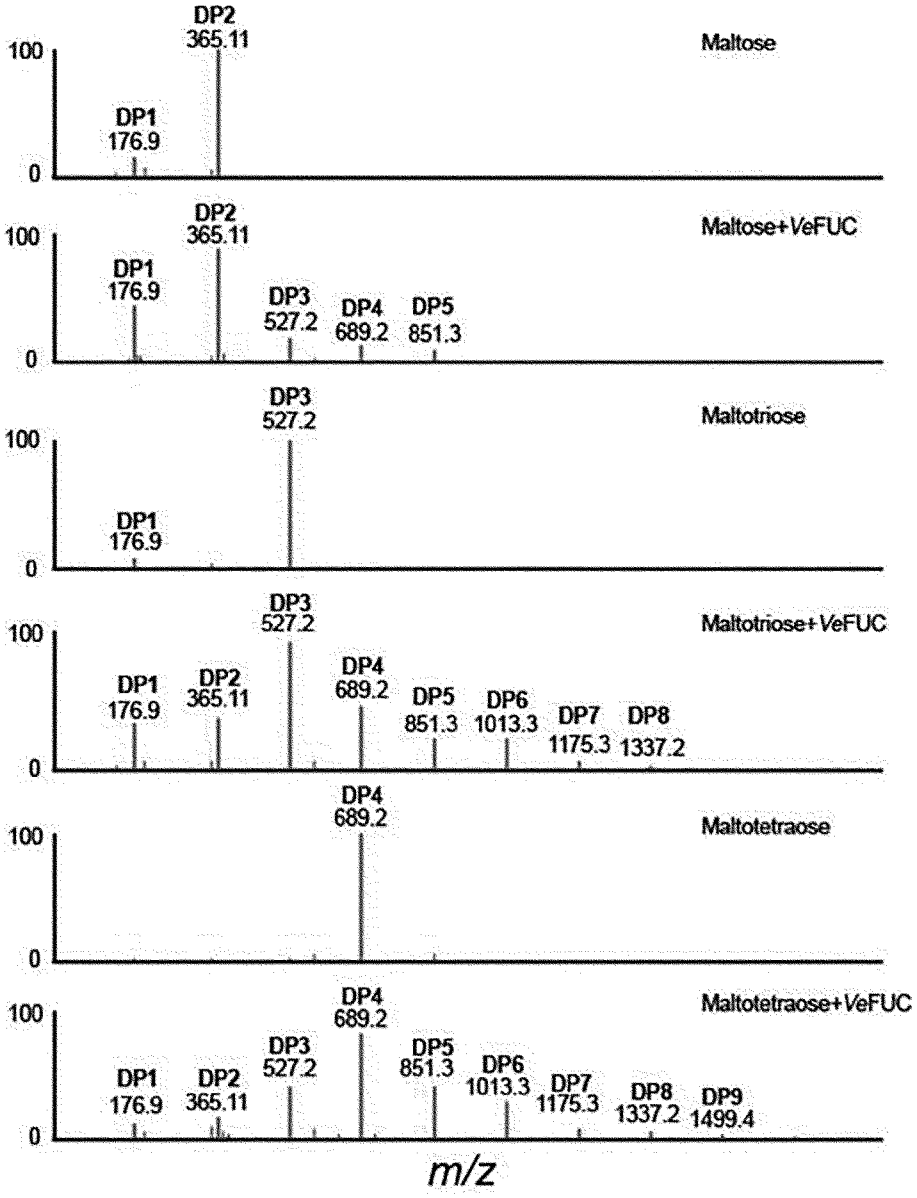
[도4i]



[도5]


A
Glc
Gal
Lac
- +
Std
Lactose
Glc
Gal
Lac
lactose
+ VeFUC
lactose
6
8
10
12
14
Retention time (min)
B
Glc
Mal
- +
Std
Maltose
Mal
Glc
maltose
+ VeFUC
maltose
6
8
10
12
14
Retention time (min)

[도6]


DP2
365.11
Maltose
100
DP1
176.9
0
DP2
365.11
Maltose+VeFUC
100
DP1
176.9
DP3
527.2
DP4
689.2
DP5
851.3
0
DP3
527.2
Maltotriose
100
DP1
176.9
0
DP3
527.2
Maltotriose+VeFUC
100
DP4
689.2
DP1
176.9
DP2
365.11
DP5
851.3
DP6
1013.3
DP7
1175.3
DP8
1337.2
0
DP4
689.2
Maltotetraose
100
0
DP4
689.2
Maltotetraose+VeFUC
100
DP3
527.2
DP5
851.3
DP6
1013.3
DP1
176.9
DP2
365.11
DP7
1175.3
DP8
1337.2
DP9
1499.4
0
m/z

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/006649

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/24(2006.01)i, C12Q 1/34(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)

C12N 9/24; C07H 1/00; C12P 19/14; C12Q 1/34

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: a-L-fucosidase, enzyme, lactose, maltooligosaccharide, substrate, production, activity, cleavage

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEZYK, M. et al. Novel a-L-Fucosidases from a soil metagenome for production of fucosyltaed human milk oligosaccharides. PLoS ONE. 22 January 2016, vol. 11, no. 1, thesis no. e0147438, (pages 1-18) See abstract, pages 2-3, 5, 15.	1-11
A	BENESOVA, E. et al. a-L-Fucosidase from Paenibacillus thiaminolyticus : Its hydrolytic and transglycosylation abilities. Glycobiology. 2013, vol. 23, no. 9, pages 1052-1065 See the entire document.	1-11
A	MEGSON, Z. et al. Characterization of an a-L-fucosidase from the periodontal pathogen Tannerella forsythia. Virulence. 2015, vol. 6, no. 3, pages 282-292 See the entire document.	1-11
A	KR 10-2016-0065111 A (JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH.) 08 June 2016 See the entire document.	1-11
A	NCBI. Genbank : HBB01954.1 (06 September 2018) See the entire document.	1-11

☐ 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
31 AUGUST 2020 (31.08.2020)	**01 SEPTEMBER 2020 (01.09.2020)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/006649

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0065111 A	08/06/2016	CN 105722991 A	29/06/2016
		CN 110628842 A	31/12/2019
		CN 110643658 A	03/01/2020
		EP 2845905 A1	11/03/2015
		EP 3572520 A1	27/11/2019
		EP 3572521 A1	27/11/2019
		JP 2016-530888 A	06/10/2016
		JP 2019-213552 A	19/12/2019
		JP 2019-213553 A	19/12/2019
		US 2016-0186223 A1	30/06/2016
		WO 2015-036138 A1	19/03/2015

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/006649

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/24(2006.01)i, C12Q 1/34(2006.01)i, C12P 19/14(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 9/24; C07H 1/00; C12P 19/14; C12Q 1/34

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: a-L-푸코시다아제(a-L-fucosidase), 효소(enzyme), 락토스(lactose), 말토올리고당(maltooligosaccharide), 기질(substrate), 생산(production), 활성(activity), 절단(cleavage)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LEZYK, M. 등, "Novel a-L-Fucosidases from a soil metagenome for production of fucosyltaed human milk oligosaccharides", PLoS ONE, 2016.01.22, 제11권, 제1호, 논문번호 e0147438, (페이지 1-18) 초록, 페이지 2-3, 5, 15	1-11
A	BENESOVA, E. 등, "a-L-Fucosidase from Paenibacillus thiaminolyticus : Its hydrolytic and transglycosylation abilities", Glycobiology, 2013, 제23권, 제9호, 페이지 1052-1065 전체 문헌	1-11
A	MEGSON, Z. 등, "Characterization of an a-L-fucosidase from the periodontal pathogen Tannerella forsythia", Virulence, 2015, 제6권, 제3호, 페이지 282-292 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2016-0065111 A (젠와인 바이오테크놀로지 게엠바하) 2016.06.08 전체 문헌	1-11
A	NCBI, Genbank : HBB01954.1 (2018.09.06) 전체 문헌	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 08월 31일 (31.08.2020)	2020년 09월 01일 (01.09.2020)

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

심사관
정다원
전화번호 +82-42-481-5373

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/006649

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:

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/006649

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0065111 A	2016/06/08	CN 105722991 A	2016/06/29
		CN 110628842 A	2019/12/31
		CN 110643658 A	2020/01/03
		EP 2845905 A1	2015/03/11
		EP 3572520 A1	2019/11/27
		EP 3572521 A1	2019/11/27
		JP 2016-530888 A	2016/10/06
		JP 2019-213552 A	2019/12/19
		JP 2019-213553 A	2019/12/19
		US 2016-0186223 A1	2016/06/30
		WO 2015-036138 A1	2015/03/19