

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 7월 5일 (05.07.2018)



(10) 국제공개번호
WO 2018/124833 A1

- (51) 국제특허분류: C12P 19/02 (2006.01) C12N 9/90 (2006.01)
C12P 19/24 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/015780
- (22) 국제출원일: 2017년 12월 29일 (29.12.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0184093 2016년 12월 30일 (30.12.2016)KR
- (71) 출원인: 주식회사 삼양사 (SAMYANG CORPORATION) [KR/KR]; 03129 서울시 종로구 종로33길 31, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이재훈 (LEE, Jae Hoon); 05507 서울시 송파구 올림픽로 435, 214동 2603호, Seoul (KR). 권순규 (KWON, Soun Gyu); 14311 경기도 광명시 소하로 56, 306동 502호, Gyeonggi-do (KR). 박부수 (PARK, Bu-Soo); 13014 경기도 하남시 위례중양로 215, 6405동 903호, Gyeonggi-do (KR). 박종진 (PARK, Chong Jin);

34049 대전시 유성구 엑스포로 448, 102동 1204호, Daejeon (KR). 안신혜 (AHN, Sin Hye); 10374 경기도 고양시 일산서구 후곡로 60, 308동 1204호, Gyeonggi-do (KR). 이상희 (LEE, Sang-Hee); 41561 대구시 북구 침산남로37길 24, 103동 1011호, Daegu (KR). 한은진 (HAN, Eun Jin); 05508 서울시 송파구 올림픽로 399, 8동 502호, Seoul (KR).

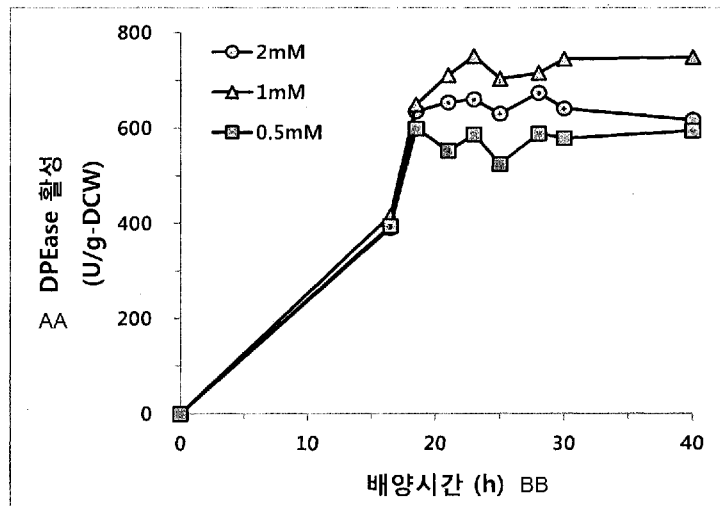
(74) 대리인: 팬코리아특허법인 (PANKOREA PATENT AND LAW FIRM); 06234 서울시 강남구 논현로85길 70, 13F, Seoul (KR).

(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,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PSICOSE BY USING PSICOSE EPIMERASE PRODUCING MICROORGANISM

(54) 발명의 명칭: 사이코스 에피머화 효소 생산 미생물을 이용한 사이코스 생산방법

【도 8b】



AA ... DPEase activity
BB ... Cultivation time

(57) Abstract: The present invention relates to a method for culturing a strain having high psicose conversion activity, and a method for producing psicose, comprising the same, and optimizes batch culture and fed-batch culture through the establishment of an optimum C/N ratio and identifies whether metal ions are required, thereby enabling high psicose conversion activity to be maintained and psicose to be efficiently mass-produced.

(57) 요약서: 본 발명은 높은 사이코스 전환 활성을 갖는 균주의 배양방법 및 이를 포함하는 사이코스 생산 방법에 관한 것으로서, 최적 C/N 비 확립을 통한 회분식, 유가식 배양 최적화 및 금속이온 요구성 여부를 확인하여 높은 사이코스 전환 활성 유지 및 효율적으로 사이코스를 대량 생산할 수 있다.



WO 2018/124833 A1

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 역
내 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), 유
럽 (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))

【명세서】

【발명의 명칭】

사이코스 에피머화 효소 생산 미생물을 이용한 사이코스 생산방법

5 【기술분야】

본 발명은 사이코스 에피머화 효소를 생산하는 미생물을 이용하여 사이코스를 효율적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

【배경기술】

10 D-사이코스(동명: 사이코스)는 과당(D-fructose)의 3번 탄소 수산화기가 이성화 반응에 의해 회전된 과당의 이성화당이며, 건포도, 무화과, 밀 등 자연계에 미량 존재하는 단당류이다. 또한 D-사이코스(동명: 사이코스)는 현대인들의 고칼로리 당류의 과도한 섭취로 인한 비만을 해결해 줄 수 있는 획기적인 감미료로써, 감미질은 설탕과 유사한 자연적인

15 단맛이며, 감미도는 설탕과 비교하여 70%이다 [Oshima H et al, 2006]. 인체 내에서 D-사이코스(동명: 사이코스)의 net energy gain은 0.007kcal/g으로(설탕 2.29 kcal/g, 과당 1.76 kcal/g) 다이어트 식품의 저칼로리 감미료로 적용이 가능하며, 당류를 저감하면서 생기는 맛의 저하현상을 극복할 수 있는 소재이다(Matsuo T et al, 2002).

20 또한 간에서의 지질합성에 관여하는 효소 활성을 억제하는 기능이 있어서, 복부지방 축적을 억제할 수 있으므로 건강식품 등 여러 기능성 식품에 응용이 가능하고, 포도당의 흡수를 억제하여 혈당 억제 작용을 하는 기능이 있어 당뇨병자용 당소재로 적용이 가능하다(Matsuo T et al, 2001, Hayashi N et al, 2010, Hossain A et al, 2015, Hossain A et al, 2015).

25 이러한 단맛의 특징과 저칼로리, 체지방 축적 억제, 당 흡수 억제 기능성을 가지고 있는 사이코스는 식품 산업에서 설탕이 차지하고 있는 광범위한 시장을 대체할 수 있는 가능성을 가지고 있는 소재이며, 비만으로 인해 야기되는 질병을 건강한 식이를 통하여 예방할 가능하게 해 줄 수 있는 소재이다.

30 현재 사이코스의 산업적인 생산을 위한 미생물 개발 현황은 Agrobacterium tumefaciens(한국, CJ), Arthrobacter globiformis(일본,

마쓰다니) 유래 D-Psicose 3-epimerse 재조합 효소가 대표적이며 현재 GRAS 인증을 받은 상태이다.

이러한 잠재적 경제적 가치가 있는 사이코스는 자연계에 극히 드물게 존재하는 단당류인 희소당에 속하기 때문에 식품산업에 적용하기 위해서는 이를 효율적으로 생산하는 방법이 필요하다. 이때 사용되는 생물학적 촉매는 기존에 개발되어 상용화된 것이 존재하지 않으므로 자체 개발이 필수적이다. 이를 위해 재조합 효소를 이용하는 경우, 고효율의 사이코스 생산이 가능하다는 장점이 있으나 안전성 입증에 많은 비용과 시간이 소모되는 단점이 있다. 반면 안전성이 입증된 자연계 균주(식용 경험이 있는 Non-GMO 균주)를 이용하는 경우, 자연계 균주 (식용 경험이 있는 Non-GMO 균주)의 개선된 사이코스 생산 능력을 고농도 배양에서 재현하는 것이 중요한 요인이 된다.

대표적 사이코스 에피머화 효소인 D-psicose-3-epimerase(DPEase)는 실제로 높은 효소 활성을 유지하면서 균체를 고농도로 배양을 하는 것이 매우 어렵다. 따라서 사이코스 산업화에 필요한 대량 생산을 위해, DPEase 최대 활성을 유지하면서도 균체를 고농도 배양하는 기술 및 이를 이용한 사이코스 생산 기술이 요구되고 있다.

【발명의 상세한 설명】

20 【기술적 과제】

본 발명의 일 예는 높은 사이코스 전환 활성을 갖는 미생물의 배양방법에 관한 것이다.

본 발명의 추가 일 예는 사이코스 전환 활성을 갖는 미생물의 사이코스 전환 활성을 증가 또는 안정화시키는 방법에 관한 것이다.

25 본 발명의 추가 일 예는 사이코스 전환 활성을 갖는 미생물의 사이코스 에피머화 효소의 활성 및/또는 발현을 증가시키는 방법, 또는 효소 활성을 안정하게 유지하는 안정화 방법에 관한 것이다.

본 발명의 추가 일예는 높은 사이코스 전환 활성을 갖는 미생물을 배양하여 과당으로부터 사이코스를 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

본 발명의 추가 일예는, 높은 사이코스 에피머화 효소를 생산하는

미생물 배양용 배지 조성물 또는 사이코스 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

5 본 발명은 사이코스 및 과당으로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상의 유도제를 이용하여, 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물을 배양하여, 상기 미생물의 사이코스 에피머라제 효소 활성을 유도 또는 안정화시키는 방법과, 상기 미생물과 유도제를 포함하는 사이코스 생산용 미생물의 배양용 조성물을 제공한다.

10 또한, 본 발명은 과당을 사이코스로 전환하는 활성을 갖는 미생물, 예를 들어 마이크로박테리움속 균주 및 기타 사이코스 전환활성을 갖는 비유전자 재조합(non-genetically modified, non-GMO) 균주를 사용하여 높은 사이코스 전환능을 얻기 위한 배양 최적 C/N 비율 확립과 이를 이용한 회분식, 유가식, 또는 연속식 배양공정의 최적화, 및 금속이온 요구성
15 여부를 확인하여 높은 사이코스 전환 활성 유지 및 효율적으로 사이코스를 대량 생산하는 조건을 확립하여 본 발명을 완성하였다.

 본 발명의 일예는 사이코스 및 과당으로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상의 유도제를 포함하는 배지에서, 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 상기 미생물의
20 사이코스 에피머라제 효소 활성을 유도 또는 안정화 시키는 방법에 관한 것이다.

 본 발명의 일예는 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물; 및 상기 미생물의 효소 활성 또는 발현 증가를 위한 유도제로서, 사이코스 및 과당으로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상의 물질을
25 포함하는, 사이코스 생산용 미생물의 배양용 조성물에 관한 것이다.

 본 발명의 추가 일예는 특정 배양 조건에서 과당을 사이코스로 전환하는 활성이 높은 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 배양 방법, 또는 상기 배양 단계 및 사이코스를 분리하는 단계를 포함하는 사이코스 생산 방법을 제공한다.

30 본 발명의 사이코스 생산방법의 일 예는 초기 배양배지를 준비하는 단계; 상기 초기 배양배지에서 사이코스 에피머라제 효소를 생산하는

미생물을 배양하여 배양액을 얻는 단계; 및 상기 배양된 미생물 또는 미생물로부터 유래된 사이코스 에피머라제 효소를 이용하여 과당 기질로부터 사이코스를 전환하는 단계를 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 사이코스 생산용 미생물의 배양용 조성물을 이용하여
 5 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물을 배양하는 경우, 사이코스 에피머라제 효소 활성을 유도 또는 안정화시킬 수 있다. 상기 효소활성은 0.4g 과당 기질 당, 2.5mg DCW의 균체를 사용하여 80°C에서 1시간 동안 반응하여 얻어진 반응물의 단위 균체 DCW(unit dry cell weight)당 사이코스 전환율 (Unit/g-DCW)을 의미한다.

본 발명에 따른 사이코스 생산용 미생물의 배양용 조성물을 이용하여
 10 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물을 배양하는 경우, 상기 효소 활성 (Unit/g-DCW)은 50 내지 5,000 Unit/g-DCW, 100 내지 3,000 Unit/g-DCW, 바람직하게는 200 내지 2,000 Unit/g-DCW, 300 내지 2,000 Unit/g-DCW, 300 내지 1,500 Unit/g-DCW 또는 400 내지 1,500 Unit/g-DCW
 15 일 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물 또는 방법에 따라 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물은 상기 범위의 효소 활성을 갖고 배양시간 30 내지 40시간에도 상기 활성을 유지하는 것 일 수 있다.

본 발명에 따른 미생물 배양을 이용하여 사이코스를 대량으로 제조하고자 하는 경우 고농도 균체 배양의 달성이 매우 중요하며, 본
 20 발명에 따른 사이코스 생산용 미생물의 배양용 조성물에서 상기 미생물을 배양하는 경우 생산 공정의 바람직한 경제성을 위해서는 배양액 중에서 건조균체 농도가 4g(dcw)/L 내지 400 g(dcw)/L, 5g(dcw)/L 내지 400 g(dcw)/L, 10g(dcw)/L 내지 300 g(dcw)/L, 15g(dcw)/L 내지 300 g(dcw)/L, 20g(dcw)/L 내지 300 g(dcw)/L, 20g(dcw)/L 내지 200 g(dcw)/L 범위가
 25 되도록 사이코스 생산용 균체를 배양할 수 있다.

본 발명이 적용 가능한 미생물은 사이코스 에피머화 효소 (D-사이코스-3-에피머라제)를 생산할 수 있는 미생물 또는 과당 기질로부터 사이코스 전환 활성을 갖는 미생물일 수 있으며, 구체적으로 사이코스 및/또는 과당에 의해 그 발현 및/또는 활성이 유도(induce)되는 사이코스
 30 에피머화 효소를 생산하는 미생물에 관한 것이다.

상기 미생물은 사이코스 에피머라제 효소를 암호화하는 내재적

유전자로 포함하는 비유전자 재조합(non-genetically modified) 미생물인 것이 바람직하다.

상기 비유전자 재조합 미생물은 자연에서 분리한 야생형 균주 또는 다양한 방법으로 돌연변이를 유도한 변이주를 포함할 수 있다. 상기 비유전자 재조합 미생물은 유전자 조작으로 인해 외래 유전자가 도입된 재조합 균주가 갖는 안정성 문제가 없어 더욱 적합하다. 또한, 상기 변이주를 제조하는 방법은 UV 또는 NTG 와 같은 외부 자극, 예를 들면 열처리를 통해 유발한 우연에 의한 돌연변이(Random Mutation)일 수 있다.

본 발명에 적용 가능한 비유전자 재조합 미생물의 예는, 10 마이크로박테리움 속 균주, 엔시퍼 속 균주, 아그로박테리움(Agrobacterium) 속 균주, 슈도모나스 (Pseudomonas) 속 균주, 로도박터(Rhodobacter) 속 균주, 코리네박테리움(Corynebacterium) 속 균주로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으며, 바람직하게는 마이크로박테리움 폴리오룸(Microbacterium foliorum, M. foliorum), 15 마이크로박테리움 옥시던스(Microbacterium oxydans), 마이크로박테리움 필로스피아라(Microbacterium phyllosphaerae) 및 엔시퍼 아드해렌스(Ensifer adhaerens, E. adhaerens)로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 균주일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, GRAS(Generally Recognized As Safe) 균주를 포함하여 산업용 미생물로 안전성이 입증된 20 균주면 가능하다. 예를 들어 본 발명에 사용되는 마이크로박테리움 속 균주는 기탁번호 KCCM11774P인 M. 폴리오룸 균주로 식품 유래 선별 분리된 개량 균주 및 상기 엔시퍼 속 균주는 기탁번호 KCCM11405P인 E. 아드해렌스 균주로 토양 유래 선별 분리된 개량 균주를 사용할 수 있다.

따라서, 본 발명의 명세서에서 사용되는 상기 용어 "미생물", 예를 들어 미생물의 균체, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의 파쇄물, 및 25 상기 파쇄물의 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 의미할 수 있으며, 상기 미생물의 균체, 미생물의 배양물, 미생물의 파쇄물 및 미생물 파쇄액의 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상에 사이코스 에피머화 효소가 포함될 수 있다. 상기 배양물은 미생물로부터 생산된 효소를 30 포함하는 것으로, 상기 미생물의 상기 미생물을 포함하거나, 미생물을 포함하지 않는 cell-free 형태일 수 있다. 상기 파쇄물은 상기 미생물을

파쇄한 파쇄물 또는 상기 파쇄물을 원심분리하여 얻어진 상등액을 의미하는 것으로, 상기 미생물로부터 생산된 효소를 포함하는 것이다.

따라서, 본 명세서에서, 사이코스 전환 활성을 갖는 생축매는 "미생물", 예를 들어 미생물의 균체, 상기 미생물의 배양물, 상기 미생물의
5 파쇄물, 및 상기 파쇄물의 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 의미할 수 있으며, 상기 미생물의 균체, 미생물의 배양물, 미생물의 파쇄물 및 미생물 파쇄액의 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상, 또는 상기로부터 얻어지는 사이코스 에피머화 효소를 포함한다.

본 발명은, 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물의
10 효소 활성 또는 발현 증가를 위한 유도제로서, 사이코스 및 과당으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 물질을 사용하는 용도에 관한 것이다. 예를 들면, 상기 유도제를 단독 탄소원으로 또는 다른 탄소원과 함께 사용하여 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 상기 미생물의 사이코스 에피머라제 효소 활성을 유도
15 또는 안정화 시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 사이코스 에피머라제 효소 활성을 유도 또는 안정화 시키는 방법에서, 상기 미생물은 유도제 이외의 탄소원을 추가로 포함하는 배지에서 배양할 수도 있다. 상기 유도제 농도(g/L)가 0.001 g/L 내지 5
20 g/L 의 범위에서 미생물을 배양할 수 있으며, 배지의 pH 변이 값(Δ pH)이 0.05 내지 0.5가 되는 조건에서 미생물을 배양할 수도 있다. 상기 유도제는 미생물을 접종하는 초기 배양배지에 첨가되거나, 유도제를 포함하는 추가 배지를 간헐적 또는 연속적으로 첨가될 수도 있다. 상기 추가 배지는 유기 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비)이 20/1 내지 1/1일 수 있다. 또한, 망간, 코발트, 칼슘, 마그네슘, 니켈, 철 및 알루미늄으로 이루어진 군에서
25 선택된 1 이상의 금속 이온을 추가로 포함하는 배지에서 상기 미생물을 배양할 수 있다.

본 발명에서 상기 유도제는 0.001 g/L 내지 5 g/L, 0.01 g/L 내지 5 g/L, 0.05 내지 g/L 5 g/L, 0.1 g/L 내지 5 g/L, .001 g/L 내지 3g/L, 0.01 g/L 내지 3 g/L, 0.05 g/L 내지 3 g/L, 0.1 g/L 내지 3 g/L, 0.001 내지
30 1.5 g/L, 0.01 g/L 내지 1.5 g/L, 0.05 g/L 내지 1.5 g/L, 또는 0.1 g/L 내지 1.5 g/L이다.

또한, 상기 유도제로서, 사이코스 및 과당으로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상의 물질을 포함하는, 사이코스 생산용 미생물의 배양용 조성물, 또는 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물 및 상기 유도제로서, 사이코스 및 과당으로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상의 물질을 포함하는 사이코스 생산용 조성물에 관한 것이다.

상기 조성물은, 유기 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비율)이 10/1 내지 1/1을 갖는, 미생물 배양용 초기 배양배지를 포함하거나, 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비율)이 10/1 내지 1/1을 갖는 미생물 배양용 초기 배양배지, 및 C/N 비율이 20/1 내지 1/1 인 추가 배지를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 조성물은 탄소원을 3 g/L 내지 30 g/L의 농도로 포함할 수 있다. 상기 조성물은 pH 6.0 내지 7.5의 범위를 갖는 것일 수 있으며, pH 변이 값(Δ pH)이 0.05 내지 0.5가 되는 조건으로 조절될 수 있다. 상기 배양용 조성물은 망간, 코발트, 칼슘, 마그네슘, 니켈, 철 및 알루미늄으로 이루어진 균에서 선택된 1 이상의 금속 이온을 포함할 수 있다.

본 발명에 따른 유도제는 단독으로 탄소원으로 사용되거나, 다른 탄소원과 함께 배지에 첨가되어 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물의 배양에 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 유도제는 상기 미생물을 접종하여 배양하는 초기 배양배지, 간헐적 또는 연속적으로 공급하는 추가 배지(feeding solution), 또는 상기 초기 배양배지 및 추가 배지 모두에 포함될 수 있다.

사이코스를 높은 수율로 생산하기 위해, 인위적으로 배지 내 사이코스 소모 속도를 조절하는 경우, 사이코스 소모 속도는 DPEase 활성 증가로 인해 배지 내에 사이코스 농도가 감소할수록 증가하여, 실제 사이코스 소모 속도에 근접하기 어려우며, 이에 따라 인위적으로 사이코스 소모 속도에 맞춰 당을 추가적으로 투입할 경우 배지 내에 당 축적을 야기시킬 수 있다. 상기 축적된 당류는, 당류 함량에 대한 균체 수율에 비례하여 균체 성장속도 향상에 기여할 수는 있으나 축적된 잔여 당류의 증가로 인해 DPEase의 활성을 급격히 감소시키는 결과를 초래한다(도 5a 참조).

또한, 사이코스의 대량 생산을 위해서는 사이코스 생산용 미생물의

고농도 배양이 바람직하나, 고농도 균체 배양이 진행됨에 따라 사이코스 에피머화 효소의 활성이 급격히 감소할 수 있다.

따라서, 효소 활성 및 발현을 사이코스 전환 활성을 증가시키고 배양기간 동안 안정적으로 사이코스 전환 활성을 유지할 수 있도록, 상기
5 사이코스 생산용 미생물의 배양 시에 유도제의 첨가할 뿐만 아니라 유도제 조건을 최적화하고, 선택적으로 유기 질소원 함량, 금속이온 농도, 및 pH 범위로 이루어지는 하나 이상의 배양 조건을 추가적으로 조절할 수 있다.

본 발명에 사용되는 미생물로서 마이크로박테리움 속 균주 또는 엔시퍼 속 균주를 사용하는 경우 사이코스 및/과당을 유도제로 사용하며,
10 추가의 탄소원 없이 상기 유도제를 탄소원으로 사용하거나 추가의 다른 탄소원을 사용할 수 있으며, 사이코스를 탄소원으로 사용하는 것이 사이코스로 배양 시 다른 제3의 미생물에 대한 오염이 억제되고, 균체당 사이코스 수율이 높고 사이코스 에피머화 효소 활성이 높아 더욱 바람직하다.

본 발명의 명세서에서 사용되는 용어 "초기 배양배지" 또는 "초기 배지"는 미생물 배양에서 미생물을 접종하여 배양하는 배양배지를 의미한다.

본 발명의 명세서에서 사용되는 용어 "추가 배지"는 초기 배양배지 이외에 미생물의 배양을 개시한 이후에 배양배지에 간헐적 또는 연속적으로
20 추가로 공급되는 배지를 의미한다.

본 발명의 명세서에서 사용되는 용어 "배양물"은 상기 초기 배양 배지, 추가 배지 또는 이들의 혼합 배지에서 미생물을 배양하여 얻은 배양물을 의미한다.

본 발명에서 상기 초기 배양배지는 유기 질소원에 대한 탄소원의
25 함량(g/L) 비율, 즉 C/N 비가 10/1 내지 10/10, 바람직하게는 10/2 내지 10/10, 또는 10/3 내지 10/10, 10/5 내지 10/10일 수 있다. 상기 범위의 C/N 비율을 갖도록 탄소원 및/또는 유기 질소원을 공급하는 경우 높은 발현 및/또는 높은 활성을 갖는 DPEase를 유도하고 효소 얻을 수 있다. 본 명세서에서 용어 "질소원에 대한 탄소원의 비율" 또는 "C/N ratio"에서
30 상기 질소원은 유기 질소원, 더욱 자세하게는 복합 유기 질소원을 말하며, 상기 탄소원은 미생물이 이용하는 통상의 탄소원의 의미이나, 탄소원이

유도제의 기능을 함께 수행할 수도 있다. 예를 들면, 상기 초기 배양 배지를 이용한 회분식 배양을 하는 경우, 초기 배지의 당농도가 낮은 경우 탄소원(예, 사이코스)이 거의 소모되는 배양 후기에 효소 활성은 비교적 높으나, 초기 배지의 당농도가 낮은 경우 균체 농도가 매우 낮아져 균체 당

5 생산 수율을 고려해야 하므로, 효소 활성과 단위 균체 당 수율을 고려하여 탄소원 함량 범위를 적절히 선택할 수 있다.

본 발명에 따른 유기 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비)이 10/1 내지 1/1인 초기 배양배지를 준비하는 단계; 상기 초기 배양배지에서 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물을 배양하는 단계; 및

10 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양액, 또는 상기 미생물 또는 미생물의 배양액에서 얻어지는 사이코스 에피머라제 효소를 과당 기질과 반응하는 것을 포함하는, 과당 기질로부터 사이코스를 전환하는 단계를 포함하는, 사이코스 생산 방법을 제공한다.

상기 미생물을 생산하기 위한 초기 배양배지의 탄소원, 예를 들어

15 사이코스를 사용하는 경우 사이코스는 유도제의 기능을 수행하는 탄소원이며, 탄소원의 초기 농도가 3 g/L 내지 50 g/L, 바람직하게는 5 g/L 내지 30 g/L, 바람직하게는 5 g/L 내지 25g/L, 더욱 바람직하게는 5 g/L 내지 20g/L, 5 g/L 내지 15g/L, 또는 10 g/L 내지 20 g/L 가 되도록 포함될 수 있다. 특히 탄소원, 예를 들어 배양 배지 내 사이코스의 초기 농도는,

20 배양 시간에 대한 균체 농도 증가율에는 크게 영향을 미치지 않으나, DPEase의 최대 활성에 영향을 미쳐 낮은 농도의 사이코스를 포함하는 경우 상대적으로 가장 높은 DPEase 활성을 얻을 수 있다.

본 발명에 따른 배지에서 사용되는 탄소원은 사이코스, 과당, 포도당, 갈락토스 및 만노스로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 사용할 수 있고,

25 바람직하게는 사이코스 및/또는 과당이다.

본 발명의 생산 방법에 사용되는 미생물의 효율적인 배양을 위한 질소원으로서 유기 질소원을 포함하며 추가적으로 무기 질소원을 포함할 수 있다. 상기 유기 질소원은 동물, 식물, 및 미생물로부터 구성된 군으로부터 유래된 1종 이상의 유기 질소화합물 또는 그의 유사체일 수 있으며, 유기

30 질소원의 예는 효모 추출물(Yeast extract), 옥수수 침지물, 소이톤(soytone), 펩톤(peptone), 대두(soybean), 대두박(soybean meal),

목화박(cottonseed meal), molasses(당밀), casein(카제인), 소고기 추출물(Beef extract), 맥아추출물(Malt extract) 및 트립톤(Tryptone) 등으로 이루어진 균에서 선택된 1 종 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 효모 추출물을 사용할 수 있다.

- 5 본 발명에 따른 미생물 배양은 배지의 pH변이 값이 0.05 내지 0.5가 되도록 수행할 수 있다. 상기 미생물 배양은 배지의 탄소원 농도(g/L)가 0 g/L 내지 5 g/L로 유지되도록 수행할 수 있으며, 선택적으로 유도제를 포함하는 추가 배지를 간헐적 또는 연속적으로 공급하면서 수행할 수 있다

- 본 발명의 미생물 배양은, 회분식(Batch) 배양, 유가식 배양(Fed-
10 batch), 및 연속식(Continuous) 배양으로 이루어진 균에서 선택된 1 이상의 방법으로 수행될 수 있으며, 바람직하게는 배양액의 탄소원이 낮은 농도로 유지되도록 유가식 배양 및 연속식 배양으로 이루어진 균에서 선택된 1 이상의 방법을 사용할 수 있다. 미생물의 성장 패턴 분석에 따라 사용자가 당의 주입속도를 결정하여 당을 주입하는 유가식 배양은 회분식 배양에
15 비해서는 생산성과 수율의 향상을 가져올 수 있다. 유가식 배양은 초기에 적당한 당 농도를 설정하여 회분식 배양을 하고 사용자가 원하는 농도의 생성물을 얻기 위해 고농도의 당을 점진적으로 주입하여 배양액 내에서 당이 낮은 농도로 유지되도록 하는 방법이다. 이때, 당의 첨가시기, 첨가방법 및 첨가량에 따라 다양한 유가식 배양방법이 존재하며, 각각의
20 조건에 따라 미생물의 성장 속도나 세포내 효소의 생산 수율 및 효소 활성 등에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어 본 발명에서 유가식 배양 또는 연속식 배양에 의한 미생물 배양은 pH 유지 당 공급(pH stat feeding) 방식으로 수행될 수 있다.

- 상기 pH 유지 당 공급 방식은 당 농도의 변화가 적고 미생물의 성장
25 경향과 잘 맞는다고 알려져 있어 호기성 미생물의 배양에 널리 사용되고 있다. DO-stat는 탄소원 고갈 시 DO (용존산소, dissolved oxygen)가 올라간다는 것에 착안하여 DO가 올라가면 탄소원을 주입해서 세포가 고농도를 자동으로 할 수 있는 장점이 있지만 DO probe센서가 pH sensor에 비해 비싸고 유지 관리가 어렵기 때문에 대량 생산을 위한 배양 시에
30 산업적으로 사용하기에는 pH stat가 더욱 바람직하다.

 따라서, pH-stat 유가식 배양방법은 미생물이 당을 섭취하고

대사하면서 발생하는 pH 강하(drop) 현상을 당 주입에 활용한 것으로서
 최소한의 당 농도를 유지하면서 미생물의 활성은 떨어뜨리지 않는 범위
 내에서 당을 주입하는 것을 목적으로 하고 있다. 이는 원하는 pH를
 설정하고 미세한 pH 상승이 있을 때 소량의 당이 주입되는 방식으로,
 5 소량의 당이 대사되면 pH는 미세하게 감소되며 당이 모두 소진되면 다시
 pH가 상승하여 당이 다시 주입되는 순환을 거듭하게 된다. 그러나, 기존
 pH-stat 방식을 통한 효소 생산은 on/off제어 방식으로 한 번 공급될 때
 pH값이 떨어질 때까지 계속 공급 되어서 일정 시간 지나면 공급 양의
 변화가 생기고 효소 활성이 떨어질 수 있다. 따라서 바람직하게는 본
 10 발명의 생산방법에 사용되는 배양방법은 발효가 진행됨에 따라 pH상승 및
 하강이 일어날 때 on/off 제어방식이 아닌 일정한 양으로 조절할 수 있는
 pulse 방식을 통해서 일정한 기질 공급량으로 세포 성장 속도를 제어 하는
 방법을 사용할 수 있다(도 1).

본 발명은 초기 배양배지 또는 배양액의 pH가 pH 6.0 내지 7.5,
 15 바람직하게는 pH 6.5 내지 7.5, 더욱 바람직하게는 pH 6.5 내지 7.0으로서,
 상기 pH 범위로 pH가 유지되도록 탄소원을 공급할 수 있다. 상기 pH로
 유지되는 경우, 당 축적이 이루어지지 않으면서 DPEase 활성을 높게 유지시킬
 수 있다.

본 발명의 미생물 배양에서 상기 pH 범위를 유지하는 방식으로
 20 탄소원을 공급하는 경우, 배양액 내 pH 변이값 또는 차이값이 0.5이하,
 0.4이하, 0.3이하, 0.2이하, 또는 0.1이하일 수 있으며, 적어도 0.05
 이상인 것이 바람직하다. 예를 들면, 배양액 내 pH 변이값은 0.05 내지 0.5,
 바람직하게는 0.05 내지 0.15로 유지되도록 탄소원을 포함하는 추가 배지를
 공급할 수 있다. 상기 pH 유지 당 공급 방식에서 수산화나트륨 혹은
 25 암모니아수와 같은 염기성 용액이 일정 pH 이하로 감소하지 않도록
 공급되게 된다. 이 때 pH 변이 값이 0.05보다 작을 경우, 염기성 용액
 공급으로 인한 pH 상승 폭이 일시적으로 0.05 보다 증가할 수 있으며, 이는
 당 고갈에 의한 pH 상승으로 인식되어 과도한 양의 당 용액이 투입되어 당
 축적을 야기시키므로 DPEase 활성 감소를 초래할 수 있다. 반면 pH 변이
 30 값이 0.5 보다 클 경우, 당이 고갈되어 있는 상태가 길어져 균체 성장
 속도를 지연시키게 되며, 이에 따라 DPEase 활성이 저해될 수 있다. 따라서

상기 pH로 유지되는 경우 당이 축적되는 시간을 최소화시키면서 효소 활성을 최대화할 수 있다.

본 발명에서 상기 미생물의 배양단계에서, 배양물 내 탄소원의 농도는 0 g/L 내지 5 g/L, 0.001 g/L 내지 5 g/L, 0.01 g/L 내지 5 g/L, 5 0.05 내지 g/L 5 g/L, 0.1 g/L 내지 5 g/L, 0 g/L 내지 3 g/L, 0.001 g/L 내지 3 g/L, 0.01 g/L 내지 3 g/L, 0.05 g/L 내지 3 g/L, 0.1 g/L 내지 3 g/L, 0 g/L 내지 1.5 g/L, 0.001 g/L 내지 1.5 g/L, 0.01 g/L 내지 1.5 g/L, 10 0.05 g/L 내지 1.5 g/L, 0.1 g/L 내지 1.5 g/L, 바람직하게는 0.1 g/L 내지 1 g/L 범위의 농도로 유지하여 당 축적이 이루어지지 않으면서 DPEase 활성을 높게 유지시킬 수 있으며, 바람직하게는 상기 pH 유지 당 공급 방식으로 배양액 내 탄소원의 농도를 상기 범위로 유지할 수 있다. 상기 유가식 및 연속식 배양에서는, 상기 수치범위의 탄소원 농도를 달성하는 것이 바람직하다.

본 발명의 미생물 배양에서 아래 수학적 식 1과 같이 추가 배지 형태로 15 탄소원(예를 들어, 당류)이 1회 공급될 때 배양액 내 증가된 탄소원 농도(g/L)로 정의되는 f값, 즉 탄소원을 포함하는 추가 배지를 1회 공급할 때 배양액 내 탄소원 농도(g/L)의 증가분이 0.2 내지 0.5, 바람직하게는 0.25 내지 0.3이다.

【수학적 식 1】

20 $f = (\text{추가 배지 공급 직후 배양액 내 탄소원 농도}) - (\text{추가 배지 공급 직전 배양액 내 탄소원 농도}).$

상기 f값이 0.5보다 작은 경우 탄소원이 축적되어 있는 시간을 줄여 간헐적 feeding 방식이 되지 않도록 할 수 있고 DPEase 활성을 높게 유지할 수 있다. 또한 f값이 0.25 이상으로 유지하여 고농도 배양에 진입함에 따라 상승하는 pH 속도가 탄소원이 투입되어 감소하는 pH 속도보다 느려 pH-stat 25 구간을 벗어나지 않도록 할 수 있다.

추가 배지에서 질소원으로서 효모 추출물을 사용하는 경우 효모 추출물은 10 g/L 내지 400 g/L, 바람직하게는 20 g/L 내지 200 g/L, 더욱 바람직하게는 60 g/L 내지 100 g/L의 농도로 추가 공급 배지에 포함될 수 있다. 상기 범위로 효모 추출물을 포함하여 균체 농도에 상관 없이 30 사이코스 에피머화 효소, DPEase의 활성이 안정적으로 유지될 수 있다.

본 발명의 추가 배지의 유기 질소원에 대한 탄소원의 비율, 즉 C/N 비는 20/1 내지 1/1, 바람직하게는 10/1 내지 2/1, 더욱 바람직하게는 10/1 내지 3/1 일 수 있으며, 상기 범위의 C/N 비를 갖는 탄소원 및/또는 질소원을 공급하여 높은 농도의 균체에서도 DPEase의 활성이 최대로 유지될 수 있다. 상기 탄소원 및 질소원은 초기 배양배지의 탄소원과 질소원에서 상술한 바와 같다.

본 발명의 생산 방법에 사용되는 초기 배양배지 또는 추가 배지는 금속 이온을 추가로 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 금속 이온은 탄소원에 첨가되거나, 상기 미생물과 탄소원과의 혼합물에 첨가될 수 있다. 또 다른 구현예에서, DPEase 생산 미생물이 고정화된 담체에 첨가되거나(탄소원 첨가 전), 상기 미생물이 고정화된 담체와 탄소원과의 혼합물에 첨가되거나(탄소원 첨가 후), 또는 탄소원 첨가시에 탄소원과의 혼합물 형태로 또는 각각 첨가될 수 있다.

상기 금속 이온은 망간 이온, 칼슘 이온, 마그네슘 이온, 니켈 이온, 코발트 이온, 철 이온, 알루미늄 이온 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 금속 이온은 과당과 DPEase의 결합력을 증가시켜 효소의 활성을 증가시키는 조효소로써 작용할 수 있다. 바람직하게는 코발트 및/또는 망간 이온을 사용할 수 있으며, 구리와 아연의 경우 활성 감소를 야기시킬 수 있다. 코발트의 경우, 식품 첨가제로 불허가 상태이지만, 망간의 경우, 식품 첨가제로 허가된 상태이다.

본 발명의 금속 이온이 추가 배지에 포함되어 공급되는 경우, 추가 공급배지 내에서 0.1 mM 내지 5 mM, 0.1 mM 내지 4 mM, 0.1 mM 내지 3 mM, 바람직하게는 0.5 mM 내지 2.5 mM의 농도로 포함될 수 있으며, 금속 이온에 따른 균체 성장 속도의 차이는 미비하나 낮은 농도 또는 높은 농도로 포함하는 경우 대비 DPEase 활성이 가장 높아 우수한 수율로 사이코스를 생산할 수 있다.

본 발명의 또 다른 예로서, 사이코스 에피머화 효소를 생산하는 미생물을 배양하기 위한 배지 조성물 또는 상기 미생물을 포함하는 사이코스 생산용 조성물을 제공한다.

상기 사이코스 생산 방법에 관한 사항은 상기 미생물 배지 조성물

또는 사이코스 생산용 조성물에 동일하게 적용될 수 있다.

본 발명은 상기 배양방법에 따라 제조된 사이코스 생산용 생축매(사이코스 전환 효소(DPEase) 또는 사이코스 전환 효소를 생산하는 미생물 균체)를 이용한 고정화 반응으로 과당-함유 기질로부터 사이코스-
5 함유 생산물로부터 분리 공정을 수행하여 액상 또는 분말상 사이코스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에서 사용되는 사이코스 전환 효소(DPEase) 또는 사이코스 전환 효소를 생산하는 미생물 균체는 담체에 포함되어 고정화 반응을 위한 칼럼에 충전될 수 있다. 이때, 사이코스 전환 효소의 활성이 높게
10 안정적으로 유지되면 생산성이 높아질 뿐아니라, 생산 속도도 빨라지는 효과가 있어 사이코스의 대량 생산 공정에서 사이코스 전환 효소의 활성이 높은 상태를 지속적으로 유지하는 것은 산업적으로 매우 중요하다.

본 발명에서 사용되는 상기 담체는 고정된 균주, 또는 상기 균주로부터 생산되는 효소의 활성이 장기간 유지될 수 있는 환경을 조성할
15 수 있는 것으로, 효소 고정화 용도로 사용할 수 있는 공지된 모든 담체일 수 있다. 예컨대, 상기 담체로서 알긴산나트륨(sodium alginate)을 사용할 수 있다. 알긴산나트륨은 해조류의 세포벽에 풍부하게 존재하는 천연 콜로이드성 다당류로, 만누로닉산(β -D-mannuronic acid)과 글루로닉산(α -L-gluronic acid)이 조성되어 있고, 함량면에서는 무작위로 베타-1,4
20 결합을 이루어 형성되어, 균주 또는 효소가 안정적으로 고정되어 우수한 사이코스 수율을 나타내는 데 유리할 수 있다.

일 구체예에서, 사이코스의 수율을 보다 증진시키기 위하여 알긴산나트륨 용액(예컨대, 알긴산나트륨 수용액)을 균주의 고정화에 사용할 수 있다. 예컨대, 균주의 균체, 상기 균주가 생산한 효소를
25 포함하는 배양액, 또는 상기 균주의 파쇄물의 1 내지 2 부피배의 알긴산나트륨 수용액에 상기 균주의 균체, 상기 균주가 생산한 효소를 포함하는 배양물, 또는 상기 균주의 파쇄물을 첨가하여 혼합한 후, 상기 얻어진 혼합액을 주사기 펌프와 진공 펌프를 사용하여 약 0.2M 칼슘 이온 용액에 떨어뜨려 비드가 생성되도록 함으로써, 알긴산나트륨 담체에 균주의
30 균체, 상기 균주가 생산한 효소를 포함하는 배양물, 또는 상기 균주의 파쇄물이 고정화시킬 수 있다. 상기 효소는 상기 균주, 균주 배양물 또는

상기 균주의 파쇄물로부터 통상의 방법, 예컨대 투석, 침전, 흡착, 전기영동, 친화 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 등의 방법에 의하여 정제된 것일 수 있다.

본 발명의 추가적인 예는 상기 효소 또는 균체와 담체를 포함하는 비드를 이용하여 과당-함유 기질을 이용하여 사이코스를 생산하는 방법을 제공한다.

바람직하게는 본 발명의 사이코스 생산 방법은 효소나 균체를 함유하는 비드를 컬럼에 충전시키고 과당-함유 기질 용액을 흘려 수행할 수 있으며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자가 사용된 효소나 균체, 또는 고정화 담체에 따라 적합한 것으로 용이하게 선택하여 수행할 수 있다.

본 발명의 일 구체예에서, 사이코스 에피머화 효소를 포함하는 균체가 충전된 충전상 컬럼에 과당 용액을 일정 농도로 공급하면, 고정화된 균체에 의해 에피머화 반응이 진행되어 과당이 사이코스로 전환된다. 전환된 사이코스는 분리탑 등을 이용해 분리 및 정제 후 사이코스 시럽(액상) 또는 분말(고상) 형태로 생산이 가능하다.

【발명의 효과】

본 발명은 DPEase를 생산하는 미생물, 예를 들어 균주를 이용하여 고수율로 사이코스를 생산하는 방법으로서, 상기 미생물을 고농도로 배양하면서도 효소 활성을 안정적으로 유지할 수 있고 높은 수율로 사이코스를 생산할 수 있어 기능성 당 관련 건강 기능성 식품 및 의약품 산업에서 폭넓게 사용될 것으로 기대된다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 명세서에 기재된 on/off 제어방식 및 pulse 제어 방식에 따른 배양 방법을 도시화한 것이다.

도 2a는 탄소원의 종류에 따른 엔시퍼속 균주의 광학 균체 농도 및 DPEase 활성을 나타낸 것이다.

도 2b는 탄소원의 종류에 따른 마이크로박테리움속 균주의 광학 균체 농도 및 DPEase 활성을 나타낸 것이다.

도 3a는 탄소원으로서 사이코스 및 과당을 사용한 회분식 배양에서

광학 균체 농도를 나타낸 것이다.

도 3b는 탄소원으로서는 사이코스 및 과당을 사용한 회분식 배양에서 잔여 당 농도를 나타낸 것이다.

5 도 3c는 탄소원으로서는 사이코스 및 과당을 사용한 회분식 배양에서 배양시간에 따른 DPEase 활성을 나타낸 것이다.

도 4a는 사이코스 초기 농도(10, 15 및 20g/L)에 따른 광학 균체 농도를 나타낸 것이다.

도 4b는 사이코스 초기 농도(10, 15 및 20g/L)에 따른 DPEase 활성을 나타낸 것이다.

10 도 5a는 간헐적 당 공급 방식으로 배양하는 경우 광학 균체 농도 및 잔여당 농도를 나타낸 것이다.

도 5b는 간헐적 당 공급 방식으로 배양하는 경우 DPEase 활성을 나타낸 것이다.

15 도 5c는 간헐적 당 공급 방식으로 배양하는 경우 사이코스 소모 속도를 나타낸 것이다.

도 6a는 pH stat 당 공급 방식으로 배양하는 경우 광학 균체 농도 및 잔여당 농도를 나타낸 것이다.

도 6b는 pH stat 당 공급 방식으로 배양하는 경우 DPEase 활성을 나타낸 것이다.

20 도 7a는 효모 추출물 농도(20, 40 및 80g/L)에 따른 광학 균체 농도를 나타낸 것이다.

도 7b는 효모 추출물 농도(20, 40 및 80g/L)에 따른 DPEase 활성을 나타낸 것이다.

25 도 8a는 망간 이온 농도(0.5, 1, 및 2mM)에 따른 광학 균체 농도를 나타낸 것이다.

도 8b는 망간 이온 농도(0.5, 1, 및 2mM)에 따른 DPEase 활성을 나타낸 것이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

30 하기 예시적인 실시예를 들어 본 발명을 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예로 한정되는 의도는 아니다.

실시에 1. 배지 탄소원의 종류가 사이코스 에피머화 효소에 미치는 영향

1.1 사용 미생물

5 유전자가 인위적으로 조작되지 않은, 사이코스 생산능을 향상시킨 변이균주 배양에 있어서 배지 탄소원은 사이코스 에피머화 효소인 DPEase의 활성화에 영향을 미칠 수 있다. 본 실시에에서 사용한 미생물은 자연진화를 가속화시켜 개량시킨 변이균주로 *Microbacterium foliorum* (*M. foliorum*) 및 *Ensifer adhaerens* (*E. adhaerens*) 두 종류의 변이균주를 사용하였다.

10 상기 *E. adhaerens* 변이 균주는 근권토양에서 분리한 그람 음성 간균으로써 사이코스 에피머화 효소인 DPEase를 함유하며, 국내공개특허 제10-2014-0122043호에 기재된 기탁번호 KCCM11405P인 *E. adhaerens* SYG29 균주로 토양 유래 선별 분리된 개량 균주이다.

또한, 상기 *M. foliorum* 균주는 비병원성이며, 포자를 형성하지 않는
15 생물안전등급 1로 분류되는 그람 양성 구균으로써 사이코스 에피머화 효소인 DPEase를 함유하고, 식품 유래 선별 분리된 개량 균주로서, 아래의 방법을 사용하여 분리하였다.

1% (w/v) 사이코스가 첨가된 Mineral salt broth (KH_2PO_4 2.4 g/L, K_2HPO_4 5.6 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.6 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, yeast extract
20 1 g/L)를 사용하였다. 식품 (예를 들어, 브로콜리, 인삼, 식용꽃 등)을 선정하여, 각각의 식품을 1g을 채취하고 MSP broth에 첨가 후 30°C에서 24시간 배양하여 증균을 실시하였다. 그 다음, 배양액 100 μL (microliter)를 취해 한천배지에 도말한 후 30°C에서 콜로니가 확인될 때까지 배양하였다. 상기 한천배지에서 형성된 콜로니 중 모양과 크기가
25 다른 콜로니를 선별하여 MSP broth에 접종 후, 30°C에서 24시간 진탕배양하고 원심분리하여 균체만 회수하였다. 회수한 균체는 50 mM PIPES(piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid)) 완충용액(pH 7.0) 100 μL 에 넣어 부유시키고, 음파진동기(Ultrasonic processor. ColepParmer)를 사용하여 파쇄하여 파쇄액을 수득하였다. 상기 파쇄액을
30 12,000rpm으로 4°C에서 10분 동안 원심분리 후, 상등액을 회수하여 효소액(crude enzyme)으로 사용하였으며, 상기 효소액을 10 mM 과당 및

사이코스를 기질로 하여 30℃에서 12시간 동안 반응시켰다.

박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC) 분석을 통해
상기 반응액에서 사이코스가 과당으로 전환되었는지 확인하였다. 상기 박층
크로마토그래피 분석은 가로 20 cm, 세로 10 cm의 실리카겔(Silica gel
5 60F254(Merck, Germany)) 고정상과 아세토나이트릴(acetonitrile)과 물을
85:15 부비피로 혼합한 이동상 전개용매를 사용하여 10분간 3번씩 전개하여
수행하였다.

상기 TLC 분석을 통해 사이코스에서 과당으로 전환이 확인된 균주를
선별하여 0.1%(w/v) 사이코스가 첨가된 MS broth에 접종하여 30℃에서
10 24시간 진탕배양 하였으며, 원심분리 후 균체만 회수하였다. 회수한 균체는
0.85%(w/v) NaCl로 세척한 후, 400 g/L 과당과 1 mM 망간 이온을 첨가한 50
mM PIPES 완충용액(pH 7.0)을 넣어 부유시키고, 70℃에서 1시간 동안
반응하였다.

그 다음, 상기 반응 결과물을 원심분리하여 상등액을 회수한 후
15 고성능 액체 크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography,
HPLC) 분석을 실시하였다. 상기 액체 크로마토그래피 분석은 Aminex HPX-
87C 컬럼(BIO-RAD)이 장착된 HPLC(Agilent, USA)의 RID(Refractive Index
Detector, Agilent 1260 RID)를 이용하여 수행하였다. 이동상 용매는 물을
사용하였고 온도는 80℃, 유속은 0.6 mL/min로 하였다. 상기 얻어진 결과를
20 도 1에 나타내었고, 1500 종의 균주 중에서 사이코스를 가장 많이 생산한
균주 1종인 *M. foliorum*을 최종 선정하였으며, *Microbacterium foliorum*
SYG27B로 명명하고, 2015년 9월 24일자로 한국미생물보존센터에 기탁하여
수탁번호 KCCM11774P를 부여 받았다.

25 1.2 배양 조건

실시에 1. 1의 균주의 배지 탄소원으로서 단당류인 사이코스, 과당,
포도당, 갈락토스 및 만노스를 이용하여 아래 표 1의 종배양 배지 구성에
따라 배지를 혼합하였으며, 모든 균주의 사멸을 위해 121℃의 온도에서
15분 이상 고온고압 증기멸균 처리하여 각각의 종균 배지를 준비하였다.
30 배양은 30℃ 의 온도 및 240 rpm에서 플라스크(flask) 배양을 실시하였다.

【표 1】

배지원	1차 종균배양
탄소원 (g/L)	5
MgSO ₄ -7H ₂ O(g/L)	0.5
Yeast extract(g/L)	2
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	7
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0.5
FeSO ₄ -7H ₂ O (mg/L)	6
MnSO ₄ -4H ₂ O(mg/L)	4
Biotin (mg/L)	0.2
Thiamine-HCl (mg/L)	0.2
Nicotinamide(mg/L)	-
소포제 (mL)	-

1.3 효소 활성 측정

실시에 1. 2의 배양이 완료된 균주의 사이코스 에피머화 효소 활성을 측정 하기 위해 0.1ml 내지 1ml의 배양액을 취한 후, 원심분리를 통해 균체와 배양액을 분리시켜 배양 상등액을 제거하여 균체를 회수하였다. 각 샘플의 균체 광학 밀도(OD, 600nm)에 기반하여 건조 균체량을 계산하였으며, 건조 균체량 대 기질 용액 부피 비 2.5 mg/ml 기준에 맞춰 건조 균체량 대비 첨가할 고농도 과당 기질 용액 부피를 계산하여 첨가하였다. 여기서 고농도 과당 기질 용액은 50 mM PIPES 완충용액(pH7.0)을 용매로 하여 400 g/L 과당과 1 mM 망간 금속이온을 첨가한 용액을 말한다.

각 샘플은 70℃의 온도에서 한 시간 동안 동일 조건에서 정치 반응시킨 후 원심분리를 통해 균체와 반응 상등액을 분리시켜 반응을 종결시켰다. HPLC 분석을 위해 반응 상등액을 고형분 함량 2% 미만으로 증류수로 희석한 후, 0.2um filter를 통과 시켜 HPLC 분석하였다. BIORAD Aminex HPX-87C 컬럼 (이동상 D.W, 유속 0.6mL/min, 온도 90℃, RT 40분)을 이용하여 HPLC 분석을 진행하였으며, 사이코스 및 과당 표준 용액을 제조하여 HPLC 면적에 대한 각각의 농도를 표준 검량 곡선을 작성하여

정량하였다. 단위 시간 당 과당으로부터 생성되는 사이코스 농도 분석을 통해 각 샘플의 효소 활성 정도를 비교하여 결과를 도 2a 및 도 2b에 도시하였다.

상기 효소활성은 0.4g 과당 기질 당, 2mg DCW의 균체를 사용하여 5 80°C에서 1시간 동안 반응한 단위 DCW 균체당 사이코스 전환율(Unit/g-DCW)을 의미한다.

도 2a에 나타난 엔시퍼 속 균주 및 도 2b에 나타난 마이크로박테리움 속 균주의 균체 농도 및 효소 활성을 보면, 특히 마이크로박테리움 속 균주는 과당으로 배양하였을 때, 엔시퍼 속 균주는 만노스로 배양하였을 때 10 균체 농도가 가장 높았으며, 다른 단당류 탄소원에서는 유사한 균체 농도를 보였다. 그러나, DPEase 활성의 경우 두 균주 모두 사이코스로 배양하였을 경우 상대적으로 매우 높은 활성을 나타냈다. 이는 다른 단당류에 비해 사이코스가 DPEase 고활성 발현에 직접적인 영향을 끼친다는 것을 의미한다. 엔시퍼 속 균주에 비해 마이크로박테리움 속 균주의 균체 성장 속도 및 15 활성이 높음을 확인하였고 이후 실시예는 마이크로박테리움 속 균주를 이용하여 진행하였다.

실시예 2. 과당 및 사이코스를 이용한 상기 미생물의 회분식 배양

M. foliorum 의 배양에 있어서 과당 혹은 사이코스를 탄소원으로 20 사용할 경우, 다른 탄소원에 비해 실시예 1의 결과와 마찬가지로 높은 균체 농도 혹은 높은 DPEase 활성을 유도할 수 있다. 양방향성 반응 효소인 DPEase는 과당과 사이코스를 기질로 직접 사용 가능하므로, 배지 탄소원으로 과당 혹은 사이코스를 사용할 경우, 고활성 DPEase 발현에 25 효과적일 수 있다. 따라서 DPEase의 기질인 과당 및 사이코스를 배지 탄소원으로 사용하는 경우 고활성 DPEase 발현과 균체 성장을 비교하였다.

M. foliorum 의 고농도 배양을 위해, 각각의 종균 배지를 상기 표 1의 조성으로 제조한 후 121°C, 15분 이상의 고온고압 증기멸균 처리하여 각 종균 배지를 준비하였다. 각각의 종균 배지 및 본 배양 배지(초기 배양 30 배지)의 조성은 가격 경쟁력과 생산성을 고려하여 아래 표 2와 같이 선정하였으며, DPEase 활성을 증가시키기 위해 과당 및 사이코스로

DPEase를 inducing하였다.

【표 2】

배지원	1차 종균배양	2차 종균배양	본 배양
사이코스 또는 과당(g/L)	5	5	10
MgSO ₄ -7H ₂ O(g/L)	0.5	0.5	1.5
Yeast extract(g/L)	2	2	4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	7	7	7
KH ₂ PO ₄ (g/L)	0.5	0.5	0.5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0.5	0.5	0.5
FeSO ₄ -7H ₂ O (mg/L)	6	6	12
MnSO ₄ -4H ₂ O(mg/L)	4	4	8
Biotin (mg/L)	0.2	0.2	0.2
Thiamine-HCl (mg/L)	0.2	0.2	0.2
Nicotinamide(mg/L)	-	-	10
소포제 (mL)	-	-	0.5

5 중균 준비는 -70℃의 온도로 보관된 *M. foliorum* 모균을 3ml 종균 배지에 접종하여 30℃의 온도 에서 24시간 1차 종균 배양한 뒤, 100 ml 종균 배지에 접종하여 30℃ 에서 24시간 2차 종균 배양을 진행하였다. 2차 종균 배지는 최종적으로 5L 발효조를 이용해 2L 본 배양 생산 배지에
 10 접종하여 30℃ 에서 배양하였다. 발효조 내로 공급되는 air는 0.2um air filter를 이용하여 제공된 상태로 사용하였으며, 표 3의 발효조 배양 조건에 따라 배양을 실시하였다.

【표 3】

배양 단계	1차 종균 배양	2차 종균 배양	본 배양
배양 장비	Test tube	플라스크	5L 발효조
배양 부피	0.003L	0.1L	2L
접종 부피	3% (v/v)	6% (v/v)	5% (v/v)

배양 시간	24hr	24hr	30-40hr
RPM	200	200	500-800
Air (vvm)	-	-	2

* vvm (volume of air per volume of liquid per minute): L/min

* 배양온도: 30°C

상기 실시예 1.3의 방법으로 과당 및 사이코스 함량 분석을 통해 각
5 샘플의 효소 활성 정도를 비교하고 결과를 도 3a 내지 도 3c에 도시하였다.

도 3a에 나타난 것과 같이, 회분식 배양에서의 대당 균체 수율을
비교해 보면 사이코스가 OD600 2.88/(1g/L 사이코스)이며, 과당이 OD600
1.13/(1g/L 과당)으로 동 농도의 당을 이용하여 사이코스가 2.5배
효과적으로 균체를 생산할 수 있어 사이코스로 배양하는 것이 더 경제성이
10 있다. 뿐만 아니라 잔여 당 분석 결과를 보면 사이코스의 경우 로그함수의
경향성을 나타내며 감소하였고 과당의 경우 1차 함수의 경향성을 나타내며
감소하였다(도 3b). 이러한 경향성은 사이코스가 과당에 비해 균체 내로
쉽게 섭취되지 못해 발생한 결과를 의미하며, 균체의 생존을 위해 고효성
DPEase 발현이 유도되는 동안 거의 당 섭취를 못하다가 DPEase 활성이 일정
15 수준 향상됨에 따라 사이코스 소모 속도가 증가됨을 의미한다. 따라서
과당에 비해 사이코스가 효과적으로 고효성 DPEase 발현을 유도할 수
있으므로 이후 실시예는 사이코스를 탄소원으로 사용하여 실시하였다.

실시예 3. 사이코스 초기 농도에 따른 상기 미생물의 회분식 배양

20 최적 사이코스 초기 배양 배지 내 탄소원 농도를 확인하기 위하여,
10g/L, 15g/L 및 20g/L로 초기 사이코스 농도를 선정하여 실시예 2와 같이
발효를 진행하였다. 또한 실시예 1.3에서 실시한 활성 측정법과 동일하게
과당의 생물전환 반응을 진행하였으며, HPLC로 사이코스 생산량을 측정하여
활성을 비교하여 얻어진 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

25 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이, 초기 사이코스 농도에 상관없이
배양시간에 대한 균체 농도 증가율이 유사함을 확인하였으며, 초기
사이코스 농도가 낮을수록 최대 DPEase 활성이 높아짐을 확인하였다.

따라서 10g/L 초기 사이코스 농도를 최적 농도로 선정하여 차후 실시예를 진행하였다.

실시예 4. 상기 미생물의 유가식 고농도 배양

4-1. 간헐적 당 공급 방식에 따른 활성 분석

5 간헐적 당 공급 방식의 효율성을 확인하기 위하여, 1.5-2.5g/L/h의 속도로 정해진 시간마다 당이 공급되게 하는 조건으로 실시예 2와 같이 발효를 진행하였다. 또한 실시예 1.3에서 실시한 활성 측정법과 동일하게 과당의 생물전환 반응을 진행하였으며, HPLC로 사이코스 생산량을 측정하여 활성을 비교하여 얻어진 결과를 도 5a 내지 도 5c에 나타내었다.

10 상기 도 5c에 나타난 것과 같이, 인위적으로 사이코스 소모 속도를 조절하는 경우, 사이코스 소모 속도는 DPEase 활성 증가로 인해 배지 내에 사이코스 농도가 감소할수록 증가하므로 실제 사이코스 소모 속도에 근접하기 어려우며, 이는 도 5a에서와 같이 당 축적을 야기시킬 수 있다. 축적된 당류는, 당류 함량에 대한 균체 수율에 비례하여 균체 성장속도
15 향상에 기여할 수는 있으나 축적된 잔여 당류의 증가로 인해 DPEase의 활성을 급격히 감소시키는 결과를 초래했다.

4.2 pH-stat 방식에 따른 활성 분석

20 pH-stat 당 공급 방식의 효율성을 확인하기 위하여, 실시예 2와 같이 발효를 진행하였다. 추가 배지 형태로 탄소원이 1회 투입될 때 배양액(발효조) 내의 탄소원 농도(g/L)의 증가분을 f 값으로 정의하여, f 값 0.25가 되게 탄소원의 투입 시간을 조절하였다. 추가 배지, 즉 Feeding 용액의 조성은 사이코스 400g/L, yeast extract 40g/L, $MnCl_2$ 1mM을 사용하였다. pH-stat 기본 원리에 따라 pH가 6.95 초과될 때 당이 공급되어
25 pH가 감소되게 하였으며, pH 범위 6.8-6.95 구간에서 9% 암모니아수와 당 용액을 통해 pH를 조절하였다. 또한 실시예 1.3에서 실시한 활성 측정법과 동일하게 활성을 측정하였으며, 활성을 비교하여 얻어진 결과를 도 6a, 도 6b 및 표 4에 나타내었다. 상기 표 4에서 균체량(DCW)은, 균체 농도를 OD_{600} 값으로 표시하는 경우 OD_{600} 값 1은 0.35 DCW/L에 해당하므로($g\text{-DCW/L}=0.35 \times OD_{600}$), OD_{600} 값은 수학식 2에 적용하여 얻을 수 있다.

[수학식 2]

$$DCW(g)/L = 0.35 (g/L) \times OD_{600}$$

[표 4]

배양시간(hr)	균체농도(OD ₆₀₀)	균체량(DCW)	효소활성(U/g-DCW)
14	7	2.45	286
16.5	11.62	4.07	447
18	13.91	4.87	460
20	20.54	7.19	584
22	26.34	9.23	616
24	31.3	10.96	671
26	37.93	13.28	489
27.5	43.88	15.36	501
32	52	18.2	446
36	56	19.6	413

도 6a에 나타난 것과 같이, 회분식 배양 18시간 이후에 pH-stat이
 5 진행되었으며, 간헐적 feeding 방식과 달리 잔여 당 농도가 0g/L 내지 1g/L
 구간 사이로 일정하게 유지되었다. 또한 간헐적 feeding 방식으로 배양한
 균체의 최대 활성이 약 500U/g 정도인데 비해, pH-stat 방식으로 배양한
 균체의 최대 활성은 약 650U/g 정도로 1.3배 증가하였다. 이는 극 소량의
 사이코스 존재할 경우, 사이코스 에피머화 효소의 활성이 증가할 수
 10 있다는 결과를 의미한다.

하지만 OD₆₀₀ 30 이상의 고농도 균체 배양이 진행됨에 따라 사이코스
 에피머화 효소의 활성이 급격히 감소하는 결과를 초래하였다. 이는 pH-stat
 과정에서 발생한 결과로 f값, pH값, feeding solution의 조성을 조절하여
 해결될 수 있음을 확인하였다.

15 f값이 너무 클 경우 탄소원, 즉 당이 축적되어 있는 시간을
 장기화시켜 결국 간헐적 feeding 방식에 가까워지게 되고 DPEase 활성
 감소를 초래할 수 있다. 반면 f값이 너무 작을 경우 고농도 배양에
 진입함에 따라 상승하는 pH 속도보다 탄소원이 투입되어 pH가 감소하는

속도가 느려 pH-stat 구간을 벗어날 수 있으며, pH-stat 조절이 불가능해질 수 있다. 도 6a의 결과를 보면 당이 축적되지 않고 일정 수준 유지되고 있으며, pH-stat 구간을 벗어나지 않고 안정적으로 진행이 되었기 때문에 f값이 크게 문제가 되었다고 보기는 어렵다. pH값은 낮을수록 고효성의 DPEase를 얻을 수 있지만 투입되는 암모니아수에 비해 높은 pH 상한 값을 가져야 하므로 현 발효조에서의 최소 값인 $\Delta pH=0.15$ 가 바람직함을 확인하였다. 따라서 나머지 변수인 feeding 용액의 조성을 조절하여 고농도 배양에서 고효성을 유지하고자 하였다.

10 실시예 5. 추가 배지 조성에 따른 활성 유지 조건 확립

실시예 4에서 상술한 바와 같이 추가 배지(feeding solution)의 조성을 조절하여 고효성 DPEase를 발현하는 고농도 균주 배양 조건을 확립하였다. 고농도 균체 배양에서 적합한 추가 배지(feeding solution)의 조성을 확립하여 높은 균체 농도에서 최대 활성이 유지되는 조건을 다음과 같이 확립하였다.

5.1 유기 질소원 농도에 따른 활성 분석

당 공급 용액에 효모 추출물(yeast extract)은 복합 유기 질소원으로 첨가할 경우 균체 성장 속도 향상 및 효소 활성 증가에 기여할 수 있다. 따라서 당 공급 용액 내 yeast extract 농도를 20, 40, 및 80 g/L로 조절하여 실시예 2와 같이 발효를 진행하였으며, pH-stat 조건은 실시예 4의 경우와 동일하게 진행하였다. 단, 추가 배지(feeding solution)의 조성은 yeast extract를 변수로 두고, 사이코스 400g/L, $MnCl_2$ 0.5mM을 사용하였다. 또한 실시예 2에서 실시한 활성 측정법을 이용하여, 효소 활성 (Unit/g-DCW)을 비교하였고 얻어진 결과를 도 7a 및 도 7b, 표 5에 나타내었다.

[표 5]

배양시간(hr)	20g/L	40g/L	80g/L
16	577	531	394
23.5	849	674	586

25.5	756	453	524
30.5	648	407	578
40	604	357	594

도 7a 및 도 7b에 나타난 것과 같이, 추가 배지(feeding solution) 내에 복합 유기 질소원인 yeast extract 농도가 증가함에 따라 DPEase 활성이 안정적으로 유지되었다. 유기 질소원의 농도가 낮을 경우 pH-stat 초기에 DPEase 활성이 가장 높았으나, 균체 농도가 높아짐에 따라 급격히 DPEase 활성이 감소하였다. 고농도 균체 농도에 의한 활성 감소없이 안정적으로 활성이 유지되는 조건을 확립해야 사이코스 산업화가 가능함을 확인하였다.

10 5.2 망간 이온 농도에 따른 활성 분석

실시에 5.1에서 저농도 yeast extract를 사용할 경우 보다 낮은 활성을 보였기 때문에 고활성, 고농도 배양을 위해 과당과 DPEase의 결합력을 증가시켜 효소의 활성을 증가시키는 조효소로서 작용할 수 있는 금속 이온, 즉 망간 이온 사용에 따른 활성을 분석하였다.

15 당 공급 용액 내 사이코스 400g/L, yeast extract 80g/L로 하고, 망간 농도를 0.5, 1.0, 및 2.0mM로 조절하여 실시예 2와 같이 발효를 진행하였으며, pH-stat 조건은 실시예 4의 경우와 동일하게 진행하였다. 또한 실시예 2에서 실시한 활성 측정법을 이용하여, 효소 활성 (Unit/g-DCW)을 비교하였고 얻어진 결과를 도 8a 및 도 8b와 표 6에 나타내었다.

20 [표 6]

배양시간(hr)	0.5mM	1.0mM	2.0mM
16.5	394	415	389
18.5	598	649	634
21	552	711	654
23	586	751	660
25	524	703	630
28	588	715	674

30	578	745	641
40	594	748	617

- 도 8a 및 도 8b에 나타난 것과 같이, 추가 배지(feeding solution) 내 망간 이온 농도에 상관없이 적절한 C/N 비로 인해 활성이 모두 안정적으로 유지되었으며, 균체 성장 속도의 차이는 미비한 수준이었다.
- 5 1mM의 망간을 사용하는 경우 DPEase 활성이 21시간 배양 이후에 약 700 U/g 이상으로, 낮은 농도인 0.5mM 또는 높은 농도인 2mM 대비 가장 높은 DPEase 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 약 700 U/g 이상으로 효소 활성이 유지되는 것은 망간 이온 농도는 1mM로 확인되었다.

(번 역 문)

특허절차를 위한 미생물 기탁의 수탁증

수 신: 삼양제넥스
 서울특별시 종로구 연지동 263
 (우) 110-725

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Microbacterium foliorum</i> SYG27B	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11774P
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. <input type="checkbox"/> 과학적 성질 <input type="checkbox"/> 분류학상 위치	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 수탁받고 2015년 9월 24일 (원기탁 일자) 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명 칭 : 한국미생물보존센터 주 소 : 서울시 서대문구 홍제내 2가길 45 유림빌딩 (우) 120-861	기탁기관 날인 : 2015년 9월 24일

위 번역문 원본과 상위없음



(번역문)

원기탁에 의한 수탁증

수신: 삼양 제넥스
 서울시 종로구 연지동 263
 (우) 110-725

I. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: <i>Ensifer adhaerens</i> SYG29	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCCM11405P
II. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 I에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. [] 과학적 성질 [] 분류학상 위치	
III. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 I.에 표시된 미생물을 수탁받고 2013년 3월 29일 수령하였다.	
IV. 국제기탁기관	
명칭 : 한국미생물보존센터 주소 : 대한민국 서울시 서대문구 홍제1동 유림빌딩 361-221 (우) 120-091	대표자 서명 : 2013년 3월 29일

위 번역문 원본과 상위 없음을 증명함



【청구의 범위】

【청구항 1】

유기 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비)이 10/1 내지 1/1인 초기 배양배지를 준비하는 단계;

5 상기 초기 배양배지에서 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물을 배양하는 단계; 및

10 상기 배양된 미생물, 상기 미생물의 배양액, 또는 상기 미생물 또는 미생물의 배양액에서 얻어지는 사이코스 에피머라제 효소를 과당 기질과 반응하는 것을 포함하는, 과당 기질로부터 사이코스를 전환하는 단계를 포함하는, 사이코스 생산 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 초기 배양배지의 탄소원은 사이코스 및 과당으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 사용하는 것인, 사이코스 생산 방법.

15 【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 배양 단계는 회분식, 유가식 또는 연속적으로 수행되는 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 4】

20 제1항에 있어서, 상기 배양 단계는 배지의 pH 변이 값이 0.05 내지 0.5이 조건에서 수행되는 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 배양 단계는 배지의 탄소원 농도(g/L)가 0 g/L 내지 5 g/L로 유지되도록, 탄소원을 포함하는 추가 배지를 공급하는 것인, 사이코스 생산 방법.

25 【청구항 6】

제5항에 있어서, C/N 비율이 20/1 내지 1/1 인 추가 배지를 간헐적 또는 연속적으로 공급하는 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 7】

30 제5항에 있어서, 상기 추가 배지 형태로 탄소원이 1회 투입될 때 배양액 내 탄소원 농도(g/L)의 증가분으로 정의되는 f값이 0.2 내지 0.5인 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 0.1 mM 내지 5 mM의 농도의 금속이온을 초기 배양배지, 추가 배지 및 이들의 혼합배지에 포함하여 공급하는 것인, 사이코스 생산 방법.

5 【청구항 9】

제8항에 있어서, 망간, 코발트, 칼슘, 마그네슘, 니켈, 철 및 알루미늄으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 금속 이온을 포함하는 추가 배지를 공급하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 10】

10 제1항에 있어서, 상기 유기 질소원은 효모 추출물(Yeast extract), 옥수수 침지물, 소이톤(soytone), 펩톤(peptone), 대두(soybean), 대두박(soybean meal), 목화박(cottonseed meal), molasses(당밀), casein(카제인), 소고기 추출물(Beef extract), 맥아추출물(Malt extract) 및 트립톤(Tryptone) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 사이코스
15 생산방법.

【청구항 11】

제5항에 있어서, 상기 추가 배지의 공급은 pH 유지 당공급(pH stat feeding) 방식으로 수행되는 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 12】

20 제11항에 있어서, 상기 pH 유지 당공급 방식은 배양액 내 pH 변이값이 0.05 내지 0.5가 되도록, 탄소원을 포함하는 추가 배지를 공급하는 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 13】

제11항에 있어서, 상기 pH 유지 당공급 방식은 C/N 비율이 20/1 내지
25 1/1 인 추가 배지를 공급하는 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 14】

제11항에 있어서, 상기 pH 유지 당공급 방식은 탄소원을 포함하는 추가 배지를 공급하며, 상기 추가 배지 형태로 탄소원이 1회 투입될 때 배양액 내 탄소원 농도(g/L)의 변이값으로 정의되는 f값이 0.2 내지 0.5인
30 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 15】

제11항에 있어서, 상기 pH 유지 당공급 방식은 배양액의 탄소원 농도(g/L)가 0 g/L 내지 5 g/L로 유지되도록 탄소원을 포함하는 추가 배지를 공급하는 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 16】

5 제1항에 있어서, 상기 미생물은 사이코스 에피머라제 효소를 암호화하는 내재적 유전자로 포함하는 비유전자 재조합체(non-genetically modified) 미생물인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 17】

10 제16항에 있어서, 상기 미생물은 마이크로박테리움 속 균주, 엔시퍼 속 균주, 아그로박테리움(Agrobacterium)속 균주, 슈도모나스(Pseudomonas) 속 균주, 로도박터(Rhodobacter) 속 균주, 코리네박테리움(Corynebacterium) 속 균주로 이루어진 군에서 선택된 1 이상, 사이코스 생산 방법.

【청구항 18】

15 사이코스 에피머라제 효소를 생산하는 균주를 배양하며, 배지 조성물 내 유기 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비)가 20/1 내지 1/1인, 고농도 균체에서 사이코스 에피머라제 효소 활성을 증가시킨, 사이코스 생산용 조성물.

【청구항 19】

20 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물; 및
상기 미생물의 효소 활성 또는 발현 증가를 위한 유도제로서, 사이코스 및 과당으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 물질을 포함하는, 사이코스 생산용 미생물의 배양용 조성물.

【청구항 20】

25 제19항에 있어서, 상기 유도제는 0.001 g/L 내지 5 g/L의 농도로 포함되는 것인 조성물.

【청구항 21】

제19항에 있어서, 상기 배양용 조성물은, 유기 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비율)이 10/1 내지 1/1을 갖는, 미생물 배양용 초기 배양배지를 포함하는 것인 조성물.

30 **【청구항 22】**

제21항에 있어서, 상기 탄소원은 3 g/L 내지 30 g/L의 농도인 조성물.

【청구항 23】

제19항에 있어서, 상기 배양용 조성물은, 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비율)이 10/1 내지 1/1을 갖는 미생물 배양용 초기 배양배지, 및 C/N 비율이 20/1 내지 1/1 인 추가 배지를 포함하는 것인 조성물.

【청구항 24】

제19항에 있어서, 상기 배양용 조성물은, 효모 추출물(Yeast extract), 옥수수 침지물, 소이톤(soytone), 펩톤(peptone), 대두(soybean), 대두박(soybean meal), 목화박(cottonseed meal), molasses(당밀), casein(카제인), 소고기 추출물(Beef extract), 맥아추출물(Malt extract) 및 트립톤(Tryptone) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 유기 질소원을 포함하는 것인 조성물.

【청구항 25】

제19항에 있어서, 상기 배양용 조성물은 pH 6.0 내지 7.5의 범위를 갖는 것인 조성물.

【청구항 26】

제19항에 있어서, 상기 배양용 조성물은 망간, 코발트, 칼슘, 마그네슘, 니켈, 철 및 알루미늄으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 금속 이온을 포함하는, 조성물.

【청구항 27】

제19항에 있어서, 상기 미생물은 사이코스 에피머라제 효소를 암호화하는 내재적 유전자로 포함하는 비유전자 재조합체(non-genetically modified) 미생물인, 조성물.

【청구항 28】

제26항에 있어서, 상기 미생물은 마이크로박테리움 속 균주, 엔시퍼 속 균주, 아그로박테리움(Agrobacterium)속 균주, 슈도모나스(Pseudomonas) 속 균주, 로도박터(Rhodobacter) 속 균주, 코리네박테리움(Corynebacterium) 속 균주로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인, 조성물.

【청구항 29】

사이코스 및 과당으로 이루어지는 균에서 선택된 1종 이상의 유도제를 포함하는 배지에서, 사이코스 에피머라제 효소를 생산할 수 있는 미생물을 배양하는 단계를 포함하는, 상기 미생물의 사이코스 에피머라제 효소 활성을 유도 또는 안정화 시키는 방법.

5 **【청구항 30】**

제29항에 있어서, 상기 유도제는 미생물의 효소 활성 또는 발현을 증가시키는 것인 유도제인 방법.

【청구항 31】

10 제29항에 있어서, 상기 유도제 이외의 탄소원을 추가로 포함하는 배지에서 배양하는 것인 방법.

【청구항 32】

제29항에 있어서, 유도제 농도(g/L)가 0.001 g/L 내지 5 g/L의 범위에서 미생물을 배양하는 것인 방법.

【청구항 33】

15 제29항에 있어서, pH 변이 값이 0.05 내지 0.5가 되는 조건에서 미생물을 배양하는 것인 방법.

【청구항 34】

제29항에 있어서, 상기 유도제를 포함하는 추가 배지를 간헐적 또는 연속적으로 첨가하여 미생물을 배양하는 것인 방법.

20 **【청구항 35】**

제29항에 있어서, 유기 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비)이 20/1 내지 1/1인 추가 배지를 간헐적 또는 연속적으로 첨가하여 미생물을 배양하는 것인 방법.

【청구항 36】

25 제34항에 있어서, 상기 추가 배지 형태로 탄소원이 1회 투입될 때 배양액 내 탄소원 농도(g/L)의 증가분으로 정의되는 f값이 0.2 내지 0.5인 것인, 사이코스 생산 방법.

【청구항 37】

30 제29항에 있어서, 유기 질소원에 대한 탄소원의 비율(C/N 비)이 10/1 내지 1/1인 초기 배양배지에서 미생물을 접종하여 배양하는 것인 방법.

【청구항 38】

제29항에 있어서, 상기 미생물은 사이코스 에피머라제 효소를 암호화하는 내재적 유전자로 포함하는 비유전자 재조합체(non-genetically modified) 미생물인, 방법.

【청구항 39】

5 제38항에 있어서, 상기 미생물은 마이크로박테리움 속 균주, 엔시퍼 속 균주, 아그로박테리움(Agrobacterium) 속 균주, 슈도모나스(Pseudomonas) 속 균주, 로도박터(Rhodobacter) 속 균주, 코리네박테리움(Corynebacterium) 속 균주로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인, 방법.

10 【청구항 40】

제29항에 있어서, 상기 미생물을 배양하는 단계는 망간, 코발트, 칼슘, 마그네슘, 니켈, 철 및 알루미늄으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 금속 이온을 추가로 포함하는 배지에서 수행되는 것인, 방법.

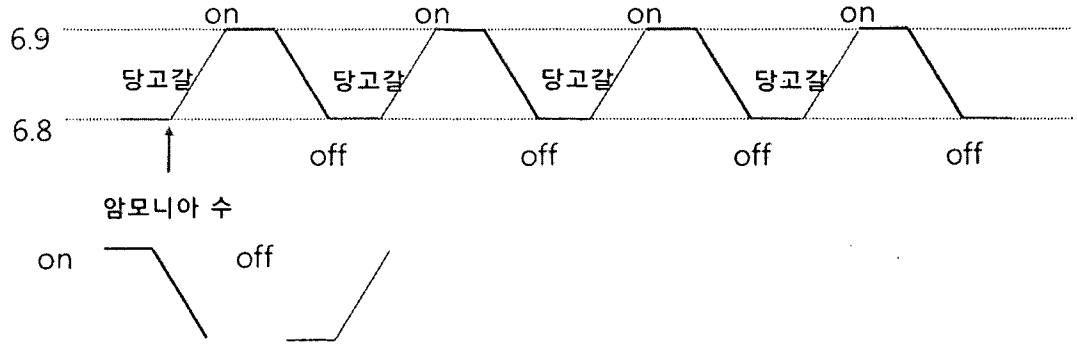
【청구항 41】

15 제29항에 있어서, 상기 배지는 효모 추출물(Yeast extract), 옥수수 침지물, 소이톤(soytone), 펩톤(peptone), 대두(soybean), 대두박(soybean meal), 목화박(cottonseed meal), molasses(당밀), casein(카제인), 소고기 추출물(Beef extract), 맥아추출물(Malt extract) 및 트립톤(Tryptone) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 유기 질소원을 포함하는 것인
20 방법.

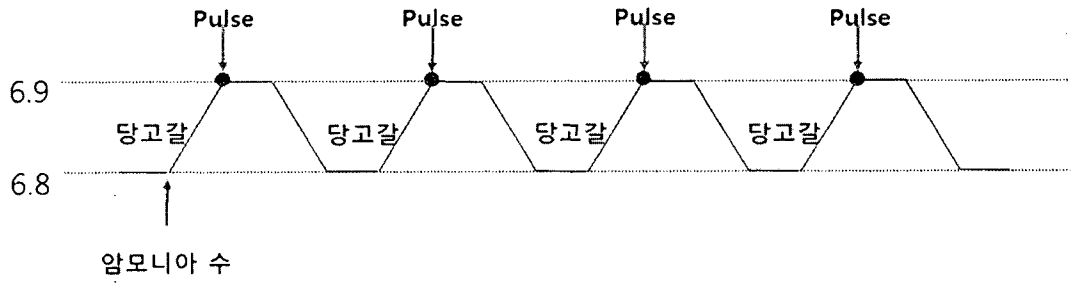
【도면】

【도 1】

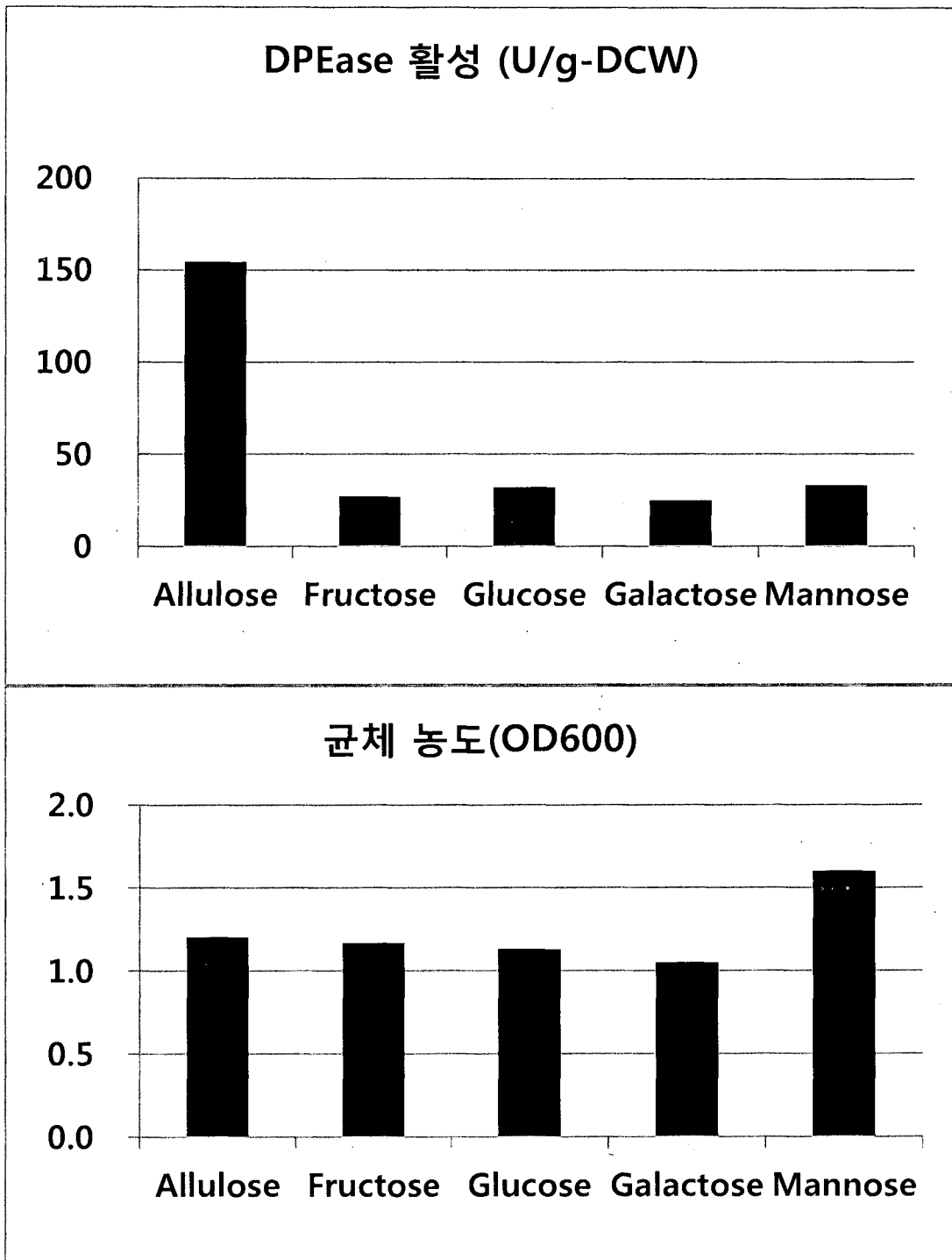
on/off 제어



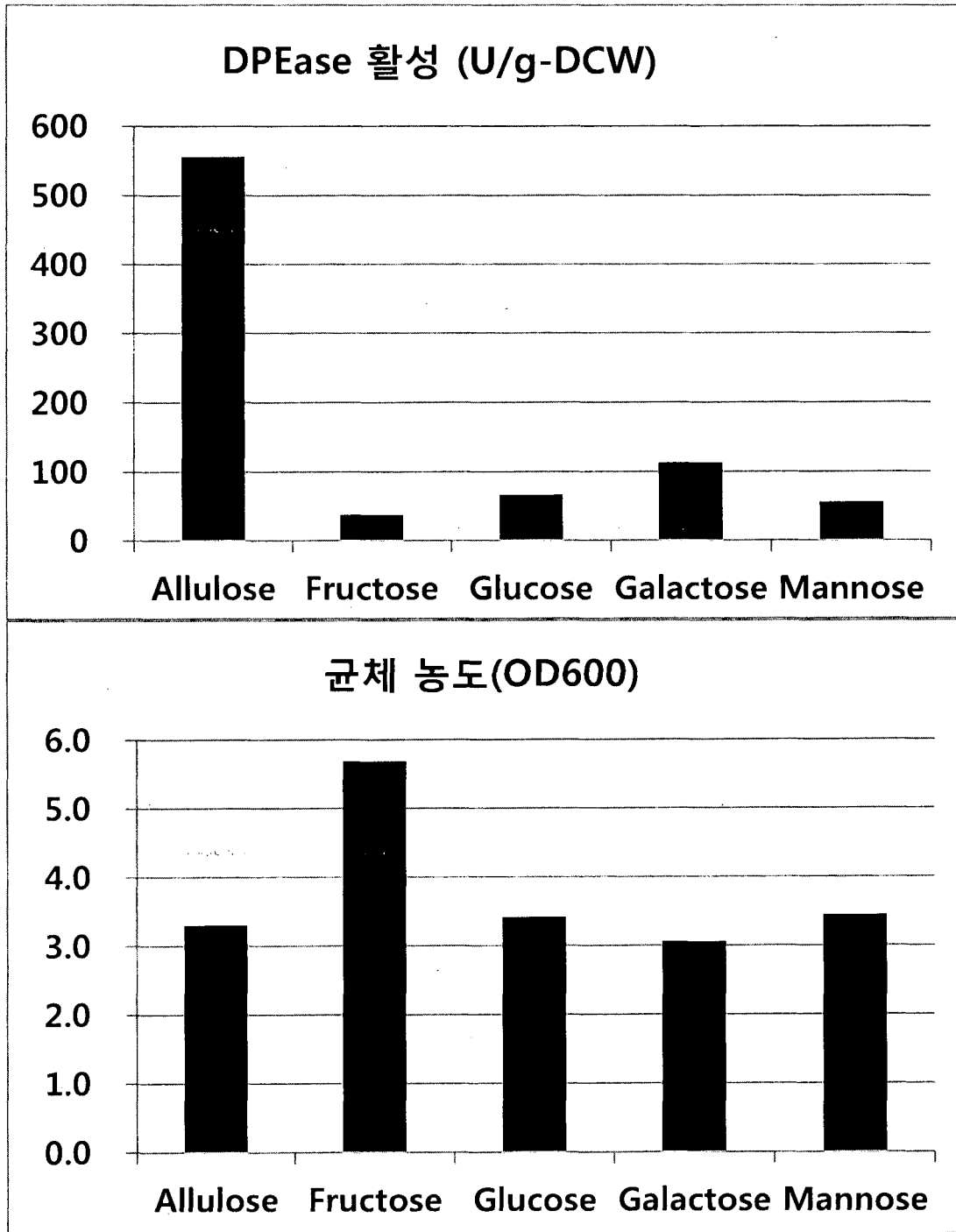
Pulse 제어



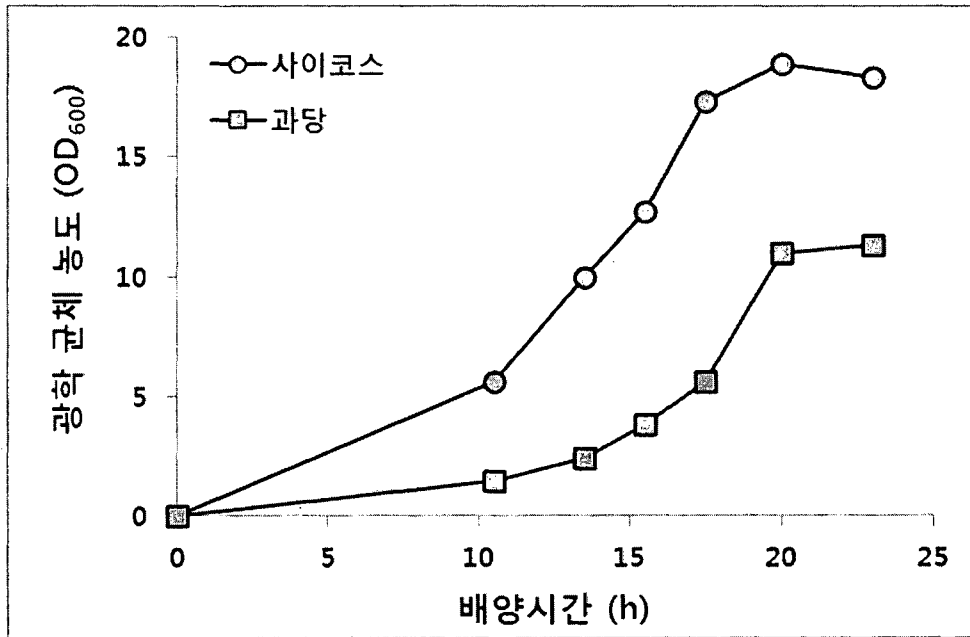
【도 2a】



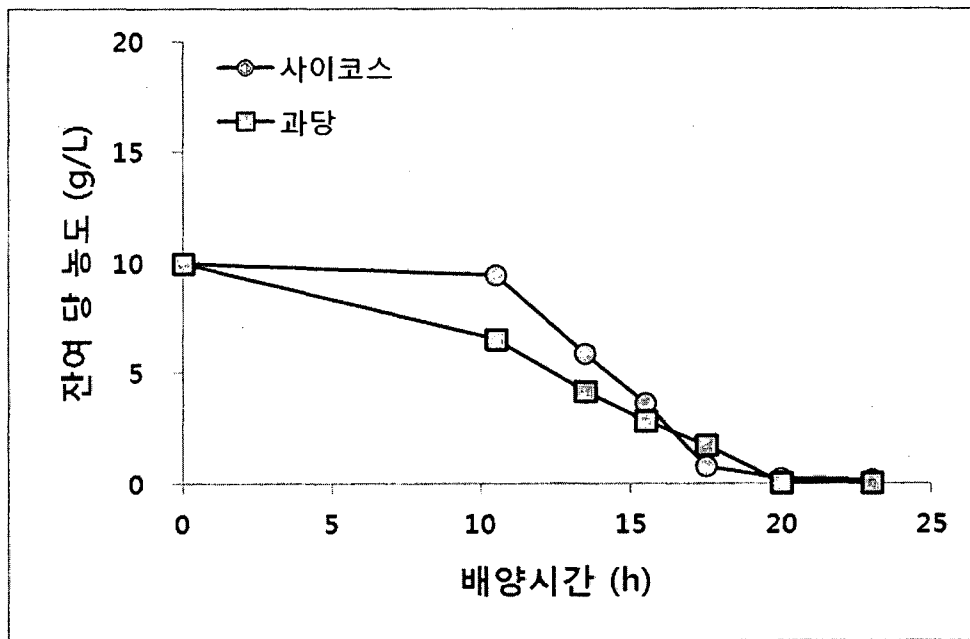
【도 2b】



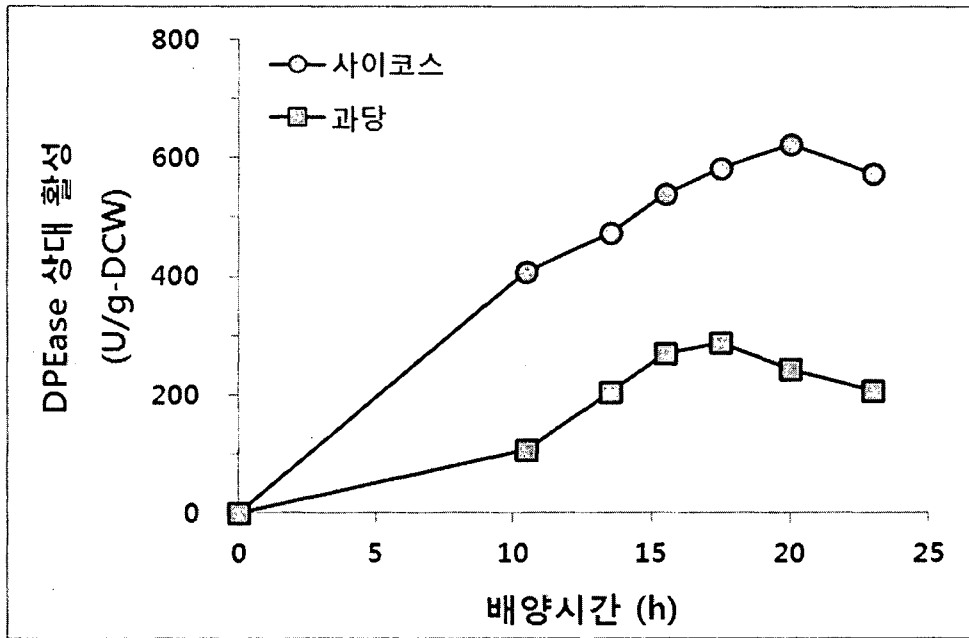
【도 3a】



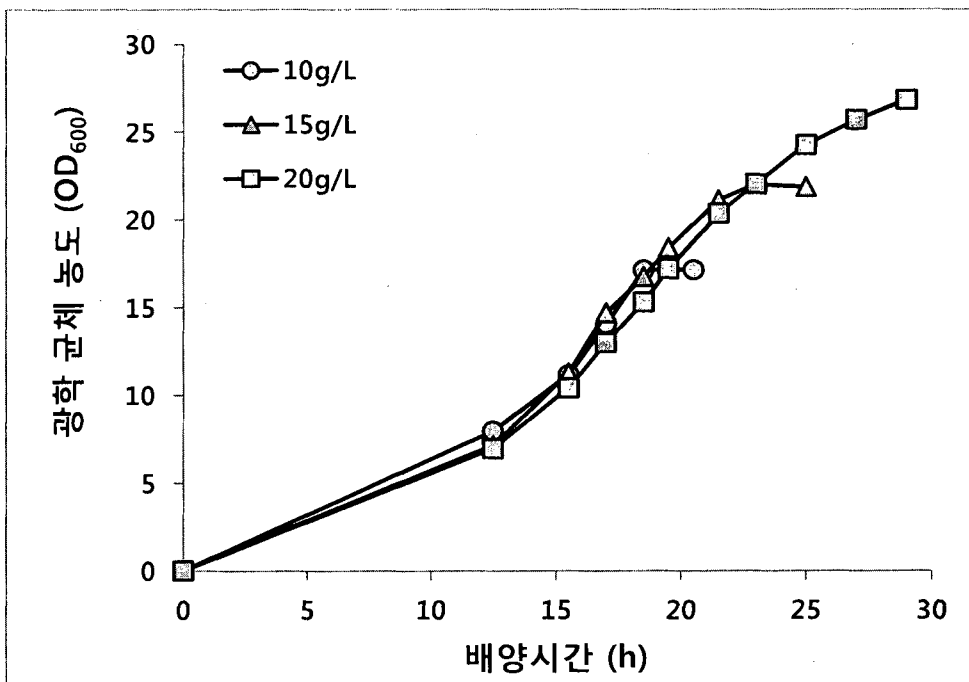
【도 3b】



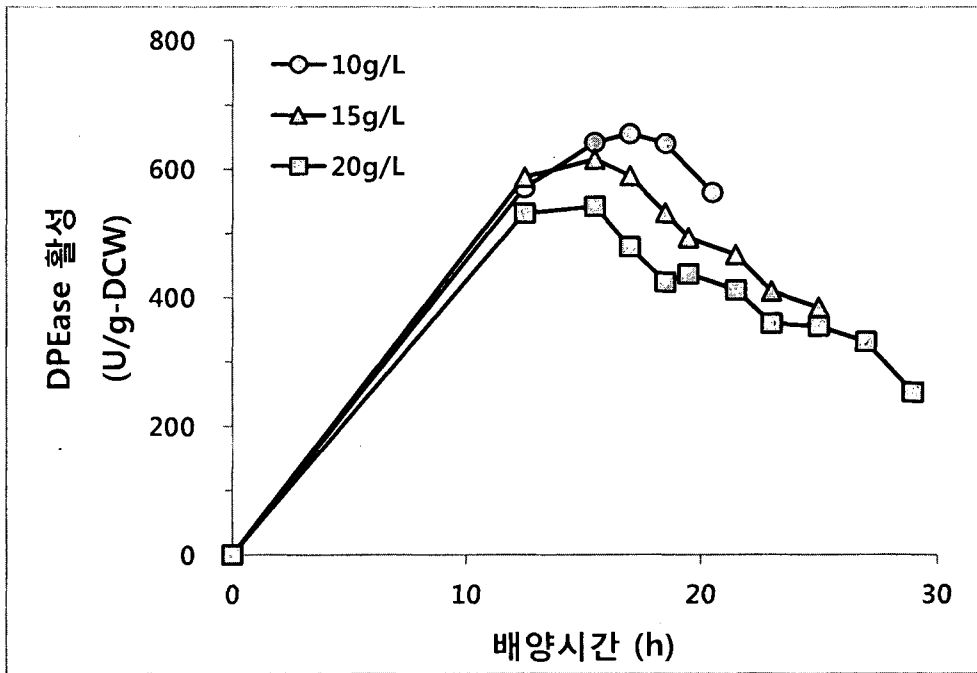
【도 3c】



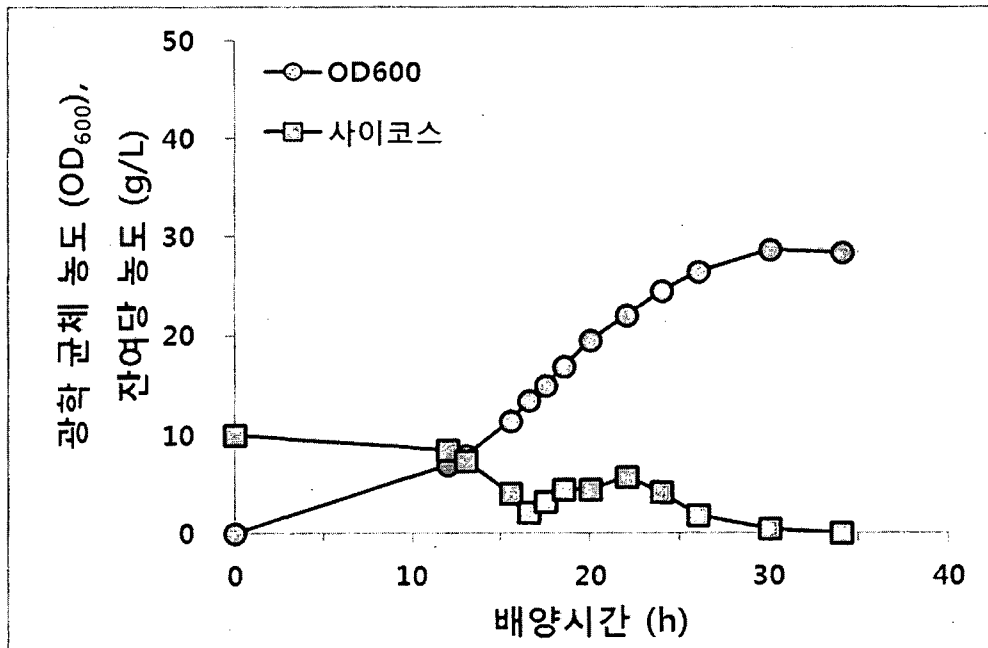
【도 4a】



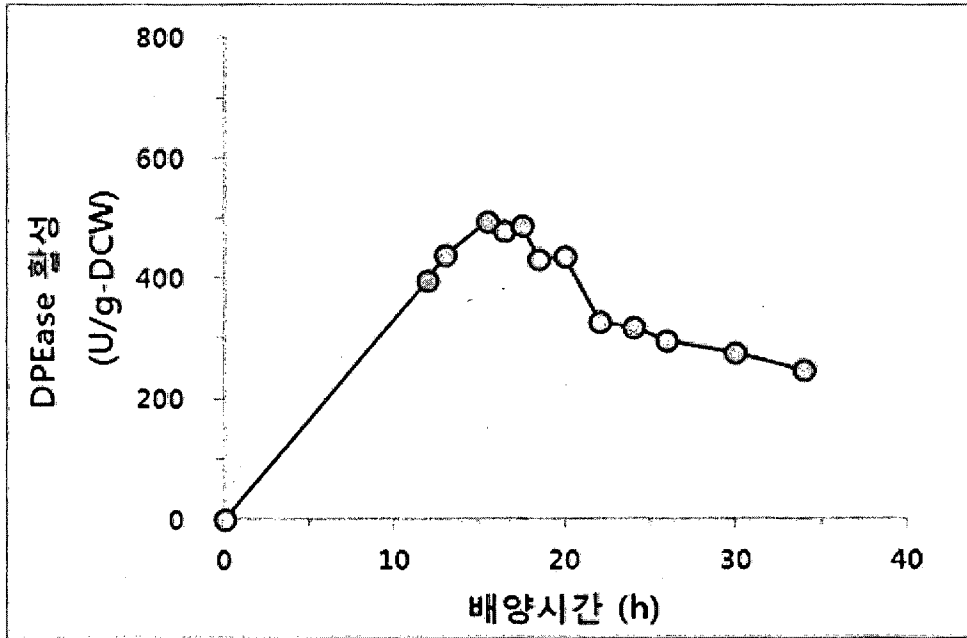
【도 4b】



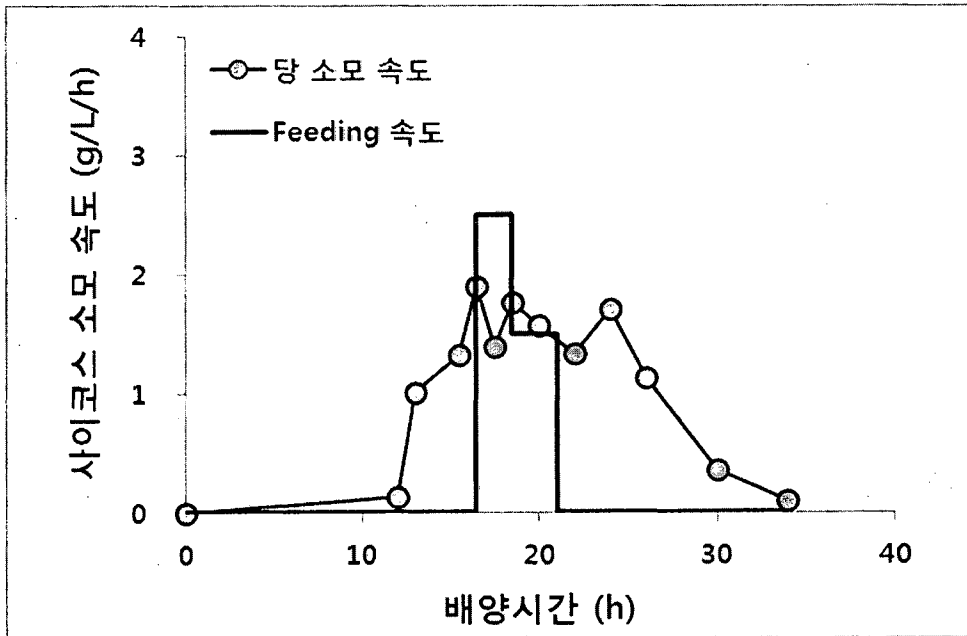
【도 5a】



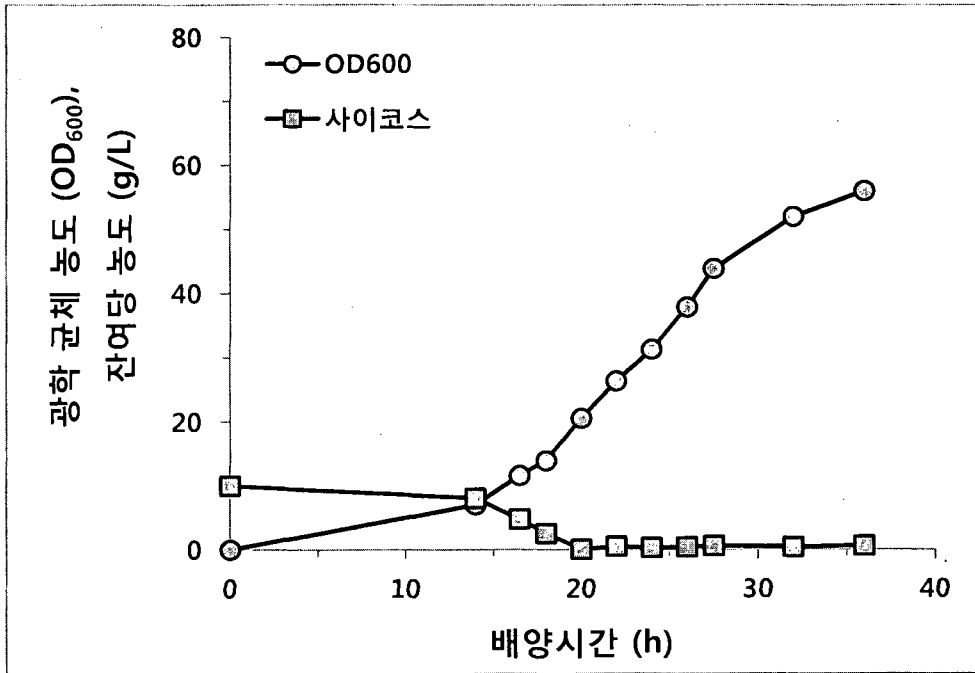
【도 5b】



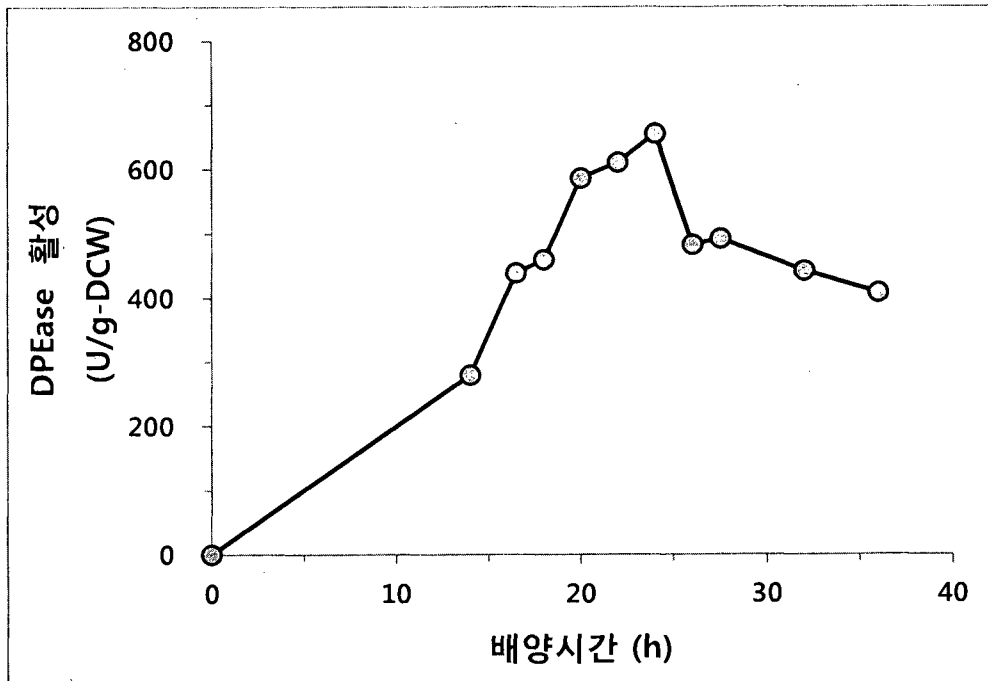
【도 5c】



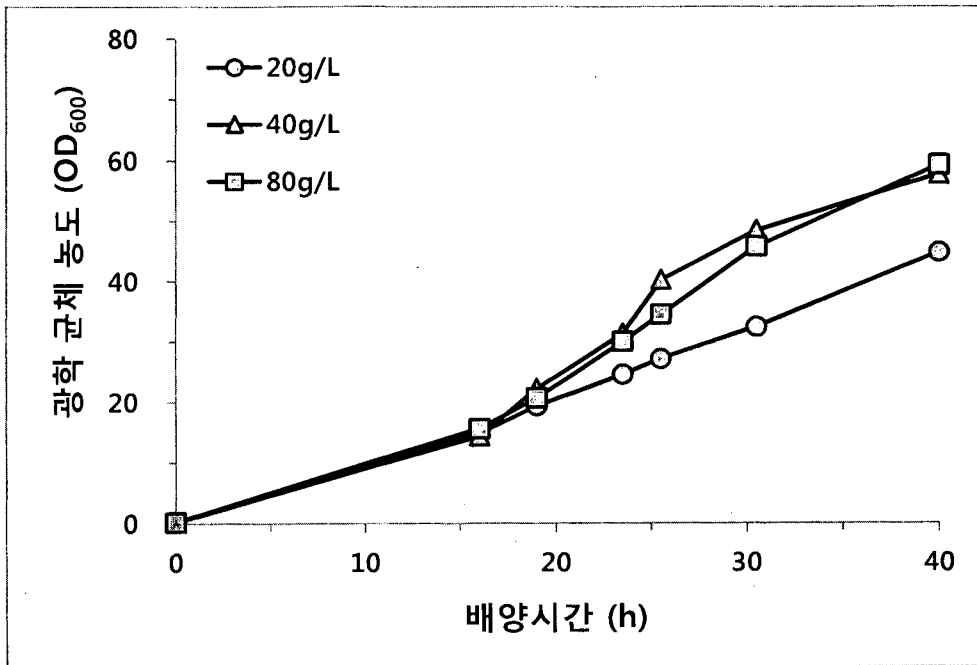
【도 6a】



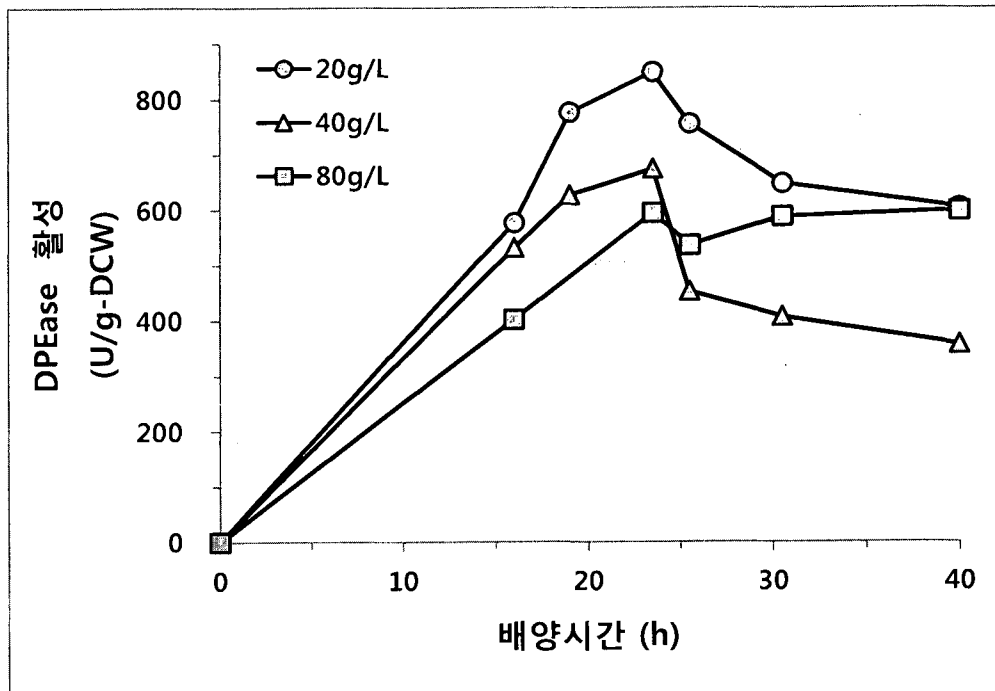
【도 6b】



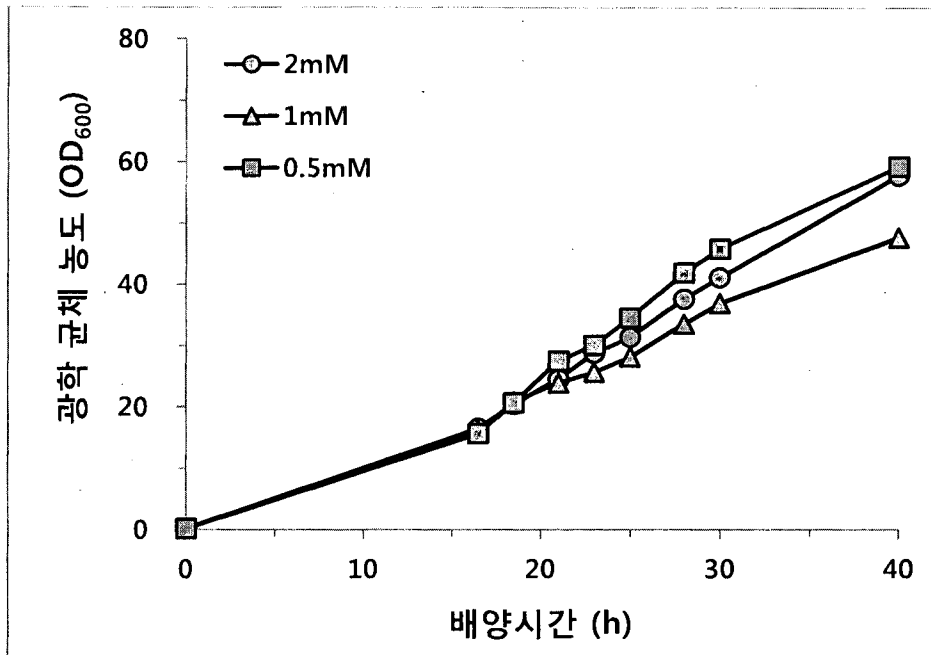
【도 7a】



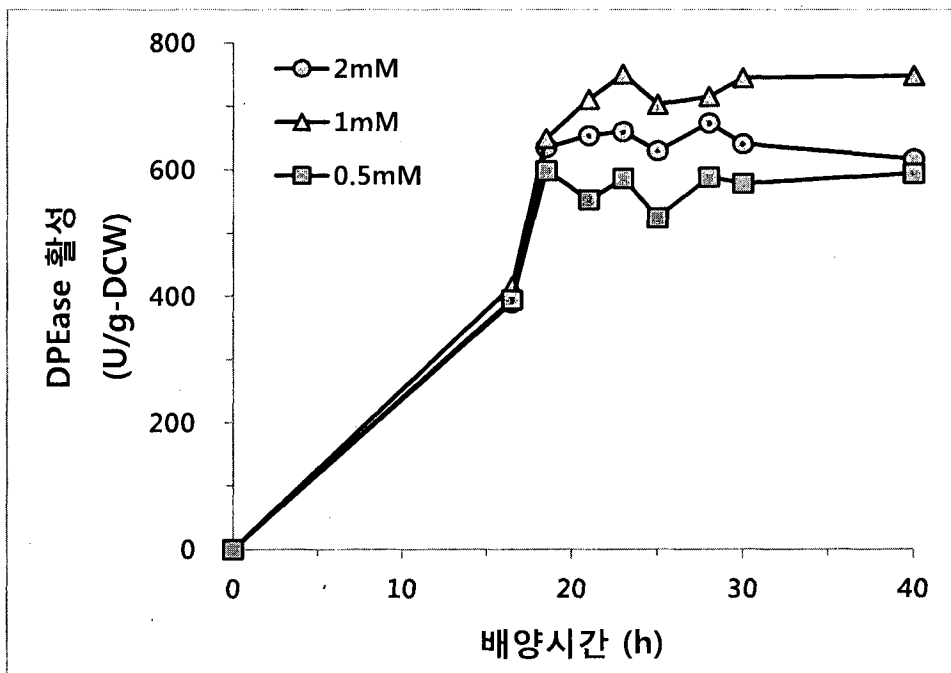
【도 7b】



【도 8a】



【도 8b】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/015780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/02(2006.01)i, C12P 19/24(2006.01)i, C12N 9/90(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 19/02; C12N 9/90; C12N 15/61; C12P 19/00; C12N 1/20; C07H 3/02; C12P 19/24

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: C/N ratio, psicose, psicose epimerase enzyme, fructose, inducing agent

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0076051 A (SAMYANG GENEX CORPORATION) 06 July 2015 See claims 6, 8 and 12; paragraphs [0033], [0048]-[0063] and [0085]-[0089].	1-41
A	KR 10-2014-0122043 A (SAMYANG GENEX CORPORATION) 17 October 2014 See claims 1-8; paragraphs [0033]-[0038].	1-41
A	KR 10-2016-0081722 A (SAMYANG CORPORATION) 08 July 2016 See claims 1, 3, 4, 7, 11, 13, 16 and 17.	1-41
A	KIM, N.-H. et al., "Conversion Shift of D-fructose to D-psicose for Enzyme-catalyzed Epimerization by Addition of Borate", Applied and Environmental Microbiology, May 2008, vol. 74, no. 10, pages 3008-3013 See the entire document.	1-41
A	PATEL, S. N. et al., "Improved Operational Stability of d-psicose 3-epimerase by a Novel Protein Engineering Strategy, and d-psicose Production from Fruit and Vegetable Residues", Bioresource Technology, 18 May 2016, vol. 216, pages 121-127 See the entire document.	1-41



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

11 APRIL 2018 (11.04.2018)

Date of mailing of the international search report

11 APRIL 2018 (11.04.2018)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/015780

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0076051 A	06/07/2015	CN 105849260 A	10/08/2016
		CN 105849261 A	10/08/2016
		EP 3087180 A1	02/11/2016
		EP 3088515 A1	02/11/2016
		JP 2017-500873 A	12/01/2017
		JP 2017-501729 A	19/01/2017
		KR 10-1539097 B1	23/07/2015
		US 2016-0304853 A1	20/10/2016
		US 2017-0211109 A1	27/07/2017
		US 9701953 B2	11/07/2017
		WO 2015-099246 A1	02/07/2015
		WO 2015-099256 A1	02/07/2015
		KR 10-2014-0122043 A	17/10/2014
KR 10-2016-0081722 A	08/07/2016	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12P 19/02(2006.01)i, C12P 19/24(2006.01)i, C12N 9/90(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12P 19/02; C12N 9/90; C12N 15/61; C12P 19/00; C12N 1/20; C07H 3/02; C12P 19/24 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:C/N 비, 사이코스, 사이코스 에피머라제 효소, 과당, 유도체		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2015-0076051 A (주식회사 삼양제넥스) 2015.07.06 청구항 6, 8 및 12; 단락 [0033], [0048]-[0063] 및 [0085]-[0089] 참조.	1-41
A	KR 10-2014-0122043 A (주식회사 삼양제넥스) 2014.10.17 청구항 1-8; 단락 [0033]-[0038] 참조.	1-41
A	KR 10-2016-0081722 A (주식회사 삼양사) 2016.07.08 청구항 1, 3, 4, 7, 11, 13, 16 및 17 참조.	1-41
A	KIM, N.-H. 등, 'Conversion shift of D-fructose to D-psicose for enzyme-catalyzed epimerization by addition of borate', Applied and Environmental Microbiology, 2008.05, 제74권, 제10호, 3008-3013 페이지 전체 문헌 참조.	1-41
A	PATEL, S. N. 등, 'Improved operational stability of d-psicose 3-epimerase by a novel protein engineering strategy, and d-psicose production from fruit and vegetable residues', Bioresource Technology, 2016.05.18, 제216권, 121-127 페이지 전체 문헌 참조.	1-41
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 2018년 04월 11일 (11.04.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 04월 11일 (11.04.2018)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일		
KR 10-2015-0076051 A	2015/07/06	CN 105849260 A	2016/08/10		
		CN 105849261 A	2016/08/10		
		EP 3087180 A1	2016/11/02		
		EP 3088515 A1	2016/11/02		
		JP 2017-500873 A	2017/01/12		
		JP 2017-501729 A	2017/01/19		
		KR 10-1539097 B1	2015/07/23		
		US 2016-0304853 A1	2016/10/20		
		US 2017-0211109 A1	2017/07/27		
		US 9701953 B2	2017/07/11		
		WO 2015-099246 A1	2015/07/02		
		WO 2015-099256 A1	2015/07/02		
		KR 10-2014-0122043 A	2014/10/17	KR 10-1647129 B1	2016/08/09
		KR 10-2016-0081722 A	2016/07/08	없음	