

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 4월 23일 (23.04.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/056923 A1

- (51) 국제특허분류: *C12N 9/24* (2006.01) *C12P 19/02* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/009470
- (22) 국제출원일: 2014년 10월 8일 (08.10.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2013-0121990 2013년 10월 14일 (14.10.2013) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-713 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김경현 (KIM, Kyoung Heon); 137-779 서울시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호, Seoul (KR). 최인걸 (CHOI, In-Geol); 156-827 서울시 동작구 남부순환로 263길 34 501호, Seoul (KR). 이찬형 (LEE, Chan Hyoung); 136-072 서울시 성북구 인촌로 22-3 207호, Seoul (KR). 김희택 (KIM, Hee Taek); 695-930 제주도

제주시 한림읍 명사로 106-7, Jeju-do (KR). 윤은주 (YUN, Eun-Ju); 153-863 서울시 금천구 시흥대로 53 14동 104호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 135-936 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

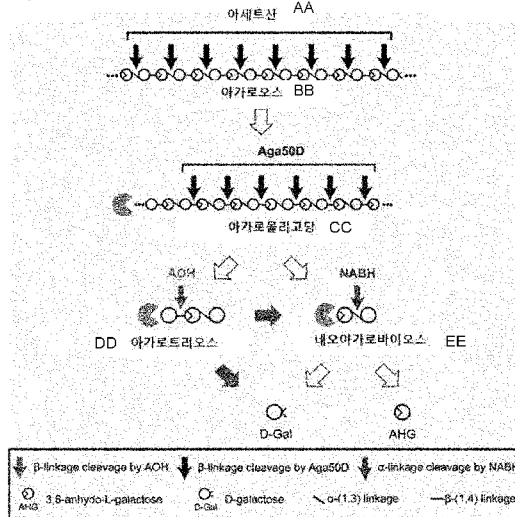
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: AGAROLIGOSACCHARIDE HYDROLASE AND METHOD FOR PRODUCING 3,6-ANHYDRO-L-GALACTOSE AND GALACTOSE FROM AGAROSE BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 아가로올리고당 분해효소 및 이를 이용한 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스의 생산방법

[Fig. 9]



AA ... Acetic acid
BB ... Agarose
CC ... Agarooligosaccharide
DD ... Agarotriose
EE ... Neoagarobiose

(57) Abstract: The present invention relates to agarooligosaccharide hydrolase and a method for producing 3,6-anhydro-L-galactose and galactose from agarose by using the same. More specifically, the production yield of 3,6-anhydro-L-galactose and galactose from agarose, that is, the saccharification efficiency, is improved by using β -agarooligosaccharide hydrolase having an agarotriose hydrolytic activity.

(57) 요약서: 본 발명은 아가로올리고당 분해효소 및 이를 이용한 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스의 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아가로트리오스 가수분해 활성이 있는 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 이용하여 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스의 생산수율, 즉 당화 효율을 개선하는 효과가 있다.



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

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 아가로올리고당 분해효소 및 이를 이용한 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스의 생산방법

기술분야

- [1] 본 발명은 아가로올리고당 가수분해 활성이 있는 신규한 베타-아가로올리고당 가수분해효소 및 이를 이용한 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 해조류는 현재 많은 분야에서 사용되고 있는 목질계 및 초본계 바이오매스에 비해 리그닌 등의 난활용성 성분의 함량이 적어 훨씬 수월하게 바이오에너지 및 바이오케미컬을 생산하기 위한 원료물질인 단당으로 전환될 수 있는 장점이 있다. 또한 식량자원을 이용하지 않기 때문에 식량자원의 에너지화에 따른 문제로부터도 자유롭다. 이러한 이유로 해조류는 대체 에너지를 비롯한 바이오케미컬 생산에 있어서 중요한 바이오매스로 각광받고 있다.
- [3] 특히 해조류 중 홍조류(예, *Gelidium amansii*)는 이러한 바이오에너지 및 바이오케미컬 생산의 원료뿐 아니라, 그 구성성분인 아가로올리고당이 항산화, 항염증, 항암, 항알러지, 미백 및 보습 등의 생리학적 활성이 우수한 것으로 보고되고 있어 의약 및 미용분야에 있어서도 그 활용도가 높다(Tomono *et al* (2009) 미국특허 제76622291호; Enoki *et al* (2005) 미국특허 제691143282호).
- [4] 홍조류의 경우 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스가 알파-1,3 결합에 의해 결합되어 있는 네오아가로바이오스를 그 기본단위로 하여 네오아가로바이오스가 베타-1,4결합으로 서로 연결되어 있는 중합체인 아가로오스를 그 주요한 구성성분으로 한다. 본 발명자들은 네오아가로바이오스를 포함한 아가로올리고당의 생리학적 기능성이 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에서 기인한다는 사실을 실험적으로 증명하였다(Yun *et al* (2013) *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(7):2961-70). 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산에 있어 수율이 매우 낮고 쉽게 과분해되는 문제점이 있는 화학적 처리방법(Jol *et al* (1999) *Anal Biochem.* 268, 213-222; Kim *et al* (2010) *Bull Korean Soc.* 31(2) 511-514)를 대신할 온화한 화학적 전처리와 효소적 당화과정을 통한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 생성공정 역시 보고한 바 있다.
- [5] 화학적 전처리 이후 처리되는 엑소-타입(exo-type)의 아가레이즈인 Aga50D 효소에 의해 주된 반응산물인 네오아가로바이오스와 아가로트리오스(D-갈락토오스-베타-1,4결합-3,6-안하이드로-L-갈락토오스-알파-1,3결합-D-갈락토오스)로 분해된다. 이후 네오아가로바이오스는

알파-네오아가로바이오스 가수분해효소인 *Sd*NABH(대한민국 등록특허 제10-1293668호)에 의해 최종적으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 가수분해된다. 이 과정에서 마일드한 조건의 화학적 전처리는 Aga50D 효소의 반응성을 향상시키는 데 있어 필수적이다. 하지만 화학적 전처리된 기질을 사용함으로써 생성되는 아가로트리오스는 최종적으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 분해되지 못하고 잔존하게 된다.

- [6] 이렇게 잔존하는 아가로트리오스를 최종적으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 분해할 수 있다면 좀 더 높은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 생산 수율 향상을 기대할 수 있다. 엔도-타입 및 엑소-타입의 베타-아가레이즈는 아가로트로오스와 같은 형태의 기질을 가수분해할 수 없기 때문에 다른 접근법으로 베타-갈락토시데이즈를 이용하여 아가로트리오스를 D-갈락토오스와 네오아가로바이오스로 분해하고자 하였으나 상업적으로 판매되고 있는 베타-갈락토시데이즈는 아가로올리고당을 분해하는 활성이 없었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 아가로올리고당 가수분해 활성이 있는 신규한 효소를 이용하여 아가로오스 당화 효율을 높이는 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 아가로올리고당 가수분해 활성이 있는 신규한 효소를 이용하여 갈락토오스를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아가로오스 분해효소; 아가로트리오스 분해 활성이 있고, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 표시되는 베타-아가로올리고당 가수분해효소(β -agarooligosaccharide hydrolase); 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는, 아가로오스 당화용 조성물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 기질은 아가로오스, 아가로트리오스 및 네오아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택되고, 본 발명에 따른 아가로오스 당화용 조성물을 상기 기질과 반응시켜 아가로오스를 당화하는 방법을 제공한다.
- [11] 본 발명은 또한 아가로트리오스, 아가로펜타오스 또는 아가로헵타오스 분해 활성이 있고, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 표시되는 베타-아가로올리고당 가수분해효소(β -agarooligosaccharide hydrolase)를 포함하는 갈락토오스 제조용 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 기질로 아가로트리오스, 아가로펜타오스 또는 아가로헵타오스를 사용하고, 본 발명의 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 상기 기질을 반응시켜 갈락토오스를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명은 아가로트리오스를 갈락토오스와 네오아가로바이오스로 분해하는 활성이 있는 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 이용하여 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 생산수율, 즉 당화효율을 개선하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 효소 별 반응물에 대한 TLC 사진도를 나타낸 것이다(PA: 전처리한 아가로오스, PAS: 전처리한 아가로오스에 대한 Aga50D와 *Sd*NABH의 반응물, PASV: 전처리한 아가로오스에 대한 Aga50D와 *Sd*NABH, 추가적으로 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3 조효소액을 반응시킨 반응물).
- [15] 도 2는 도 1의 PAS 및 PASV의 환원당량을 DNS 정량법으로 측정한 결과를 막대그래프로 나타낸 것이다.
- [16] 도 3은 본 발명의 정제된 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 SDS-PAGE 사진도이다.
- [17] 도 4는 본 발명의 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 최적 온도 및 pH 확인 결과로, (a)는 아가로트리오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 최적 pH, (b)는 아가로트리오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 최적 온도를 나타낸다(M: 단백질 마커; 레인 1: HisTrap HP column을 이용하여 1차 정제된 베타-아가로올리고당 가수분해효소; 레인 2: HisTrap Q FF column을 이용하여 2차 정제된 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 나타냄).
- [18] 도 5는 아가로트리오스 기질에 대한 본 발명의 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 활성 확인 결과로, (a)는 아가로트리오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 반응 시간 별 기질 및 생성물의 변화 양상을 HPLC로 확인한 결과, (b)는 아가로트리오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응 시간 별 기질 및 생성물의 변화 양상을 HPLC로 확인한 결과이다.
- [19] 도 6은 아가로트리오스, 아가로펜타오스, 아가로헵타오스 기질에 대한 본 발명의 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 활성 확인 결과로, (a)는 각 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 반응산물을 TLC로 확인한 결과, (b)는 각 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응 반응산물을 TLC로 확인 결과이다.
- [20] 도 7은 다양한 기질에 대한 본 발명의 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 활성을 확인한 결과이다(표준물질로 글루코오스, 갈락토오스 표준물질을 사용).
- [21] 도 8은 다양한 기질에 대한 대장균 유래 베타-갈락토시데이즈 가수분해효소의

활성을 확인한 결과로(표준물질로 글루코오스, 갈락토오스 표준물질을 사용), (a)는 락토오스, 락토-N-네오테트라오스, 락토티불로오스, 4- β -갈락토바이오스, α -1,3- β -1,4-갈락토티리오스에 대한 각각의 효소 반응 결과, (b)는 아가로트리오스, 아가로펜타오스, 아가로헵타오스에 대한 각각의 효소 반응 결과이다.

- [22] 도 9는 본 발명의 베타-아가로올리고당 가수분해효소(AOH)를 활용한 아가로오스 당화 과정 모식도를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [23] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [24] 본 발명은 아가로오스 분해효소; 아가로트리오스 분해 활성이 있고, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 표시되는 베타-아가로올리고당 가수분해효소(β -agarooligosaccharide hydrolase); 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는, 아가로오스 당화용 조성물에 관한 것이다.
- [25] 본 발명의 아가로오스 당화용 조성물은 아가로올리고당 가수분해 산물인 아가로트리오스를 네오아가로바이오스와 D-갈락토오스로 가수분해하는 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 아가로오스 당화에 사용함으로써 종래기술에서는 가수분해되지 않고 잔존하는 아가로트리오스를 효과적으로 분해하여 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스의 생산 효율 즉, 아가로오스 당화 효율을 현저히 개선한 것을 특징으로 한다.
- [26] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 환원당 정량법(DNS법)으로 환원당량을 확인한 결과, 아가로오스를 전처리만 하였을 경우 당화율은 약 20%이고, 종래의 효소적 처리 즉, 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 처리한 경우에는 50%까지 상승한다. 반면, 상기 효소적 처리 시 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 추가로 처리하여 아가로트리오스를 가수분해한 경우 70%의 당화율을 나타낸다.
- [27] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 기존에 보고된 베타-갈락토시데이즈가 나타내는 활성을 보이지 않으며, 그 대신 아가로트리오스 뿐 아니라 다양한 아가로올리고당(n), 예컨대, 아가로펜타오스, 아가로헵타오스의 비환원성말단에 작용하여 아가로올리고당을 D-갈락토오스와 네오아가로바이오스(n-1)로 가수분해할 수 있다.
- [28] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [29] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 SEQ ID NO: 1로 표시되는 아미노산 서열 뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로트리오스 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('AOH'라고도 함).

- [30] 본 발명에서 폴리펩티드가 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 백분을 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.
- [31] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다. 본원에서는 아미노산 잔기에 대하여 통상의 1문자 또는 3문자 코드가 사용된다.
- [32] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"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, 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.
- [33] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다.
- [34] 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.
- [35] 상기 베타-아가로울리고당 가수분해효소는 효소의 코딩 영역 전 및 후의

영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩티드를 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.

- [36] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [37] 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. 또한 본 발명의 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 예컨대 대장균에 형질전환시켜 형질전환된 대장균의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있다.
- [38] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 HisTrap HP column과 HisTrap FF column을 이용하여 분리 정제할 수 있다. 분리 정제된 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 분자량은 일 구체예에 따르면, SDS-PAGE 분석 결과 대략 90kDa일 수 있다.
- [39] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 GH family 2에 속하는 효소로, 다른 GH family 2에 속하는 베타-갈락토시다레이즈들과의 활성을 비교할 경우, 종래의 보고된 베타-갈락토시다레이즈는 아가로트리오스를 분해하여 D-갈락토오스 및 네오아가로바이오스를 생산하는 활성을 나타내지 않으나, 본 발명의 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 유래의 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소만이 아가로트리오스 분해 활성을 나타낼 수 있다.
- [40] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 아가로트리오스에 대해 약 30 내지 40°C에서, 약 pH 5 내지 9.6에서 최적 활성을 나타낼 수 있다.
- [41] 또한, 본 발명의 아가로오스 당화용 조성물은 아가로올리고당을 분해하여 아가로트리오스와 이당체인 네오아가로바이오스를 생산하는 아가로오스 분해효소를 포함한다.
- [42] 상기 아가로오스 분해효소는 아가로오스의 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 사이의 β -1,4-글리코사이드 결합을 절단하는 효소('Aga50D'라 함)를 사용할 수 있다.
- [43] 상기 아가로오스 분해효소는 SEQ ID NO: 3에 기재된 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 아가로올리고당 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 3에 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.
- [44] 상기 효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [45] 상기 아가로오스 분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T의 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.
- [46] 재조합 기술을 이용하는 경우, 상기 아가로오스 분해효소는 식용균주, 예컨대 효모에 형질전환시켜 형질전환된 효모의 배양물 상등액을 대체하여 이용할 수 있다.
- [47] 또한, 본 발명의 아가로오스 당화용 조성물은 네오아가로바이오스를 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스로 분해할 수 있는 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소('sdNABH'라 함)를 포함한다.
- [48] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 SEQ ID NO: 4에 기재된 아미노산 서열 뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 네오아가로바이오스 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 4에 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.
- [49] 상기 효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [50] 상기 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40^T의 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.
- [51] 재조합 기술을 이용하는 경우, 식용균주, 예컨대 효모에 형질전환시켜 형질전환된 효모의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있다.
- [52] 본 발명의 아가로오스 당화용 조성물은 전처리된 아가로오스와, 아가로오스 분해효소, 베타-아가로올리고당 가수분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 효소 혼합물을 반응시키거나,
- [53] 전처리된 아가로오스와, 아가로오스 분해효소, 베타-아가로올리고당 가수분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 반응시켜 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 D-갈락토오스를 제조할 수 있다.
- [54] 본 발명은 또한 기질은 아가로오스, 아가로트리오스 및 네오-아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택되고, 본 발명에 따른 아가로오스

당화용 조성물을 상기 기질과 반응시켜 아가로오스를 당화하는 방법에 관한 것이다.

- [55] 본 발명의 아가로오스를 당화하는 방법은 전처리된 아가로오스에 엑소-타입의 베타 아가레이즈인 아가로오스 가수분해효소, 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소 및 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 반응시켜 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 D-갈락토오스를 제조하는 것을 특징으로 한다.
- [56] 상기 전처리된 아가로오스는 아가로오스에 약산을 처리하여 아가로올리고당을 제조하는 것을 의미한다.
- [57] 상기 약산은 아세트산(Acetic acid), 포름산(Formic acid), 숙신산(Succinic acid), 시트르산(Citric acid), 말산(Malic acid), 말레산(Maleic acid) 또는 옥살산(Oxalic acid) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [58] 상기 약산은 생산단가 및 약산 중화 후 생성되는 염의 분리를 고려하여 0.5 내지 60%(w/v)의 농도로 사용하는 것이 좋다. 보다 구체적으로 20 내지 40%(w/v)의 농도로 사용할 수 있다.
- [59] 상기 아가로오스 및 약산의 반응은 40 내지 150°C의 온도 범위에서 100 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 6시간 동안 실시할 수 있다. 상기 범위 내일 경우 약산에 의한 아가로오스의 과분해산물을 최소화할 수 있다.
- [60] 상기 반응 후 얻은 반응산물은 아가로올리고당으로 잔존하는 약산과 과분해산물을 제거하기 위해 세척 후 건조하여 분말상태로 수득할 수 있다.
- [61] 상기 세척 용매로 탄소 수 1 내지 6의 저급 알코올을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [62] 상기에서 얻은 아가로올리고당의 효소적 분해를 위해 엑소 타입의 아가로오스 가수분해효소, 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소 및 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 사용한다.
- [63] 아가로오스 가수분해효소는 아가로올리고당을 아가르트리오스와 네오아가로바이오스로 분해하고, 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 아가르트리오스를 D-갈락토오스와 네오아가로바이오스로 분해하며, 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 네오아가로바이오스를 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해한다.
- [64] 따라서, 아가로올리고당의 기존의 효소적 분해 시 잔존하는 아가르트리오스는 베타-아가로올리고당 가수분해효소에 의해 분해되어 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산 수율이 개선되는 것이다.
- [65] 상기 전처리된 아가로오스와, 아가로오스 분해효소, 베타-아가로올리고당 가수분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 효소 혼합물을 반응시키거나,
- [66] 전처리된 아가로오스와, 아가로오스 분해효소, 베타-아가로올리고당 가수분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 반응시켜 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 D-갈락토오스를

제조할 수 있으며,

- [67] 상기 아가로올리고당과 효소 혼합물의 반응 또는 아가로올리고당과 효소들의 순차적 반응은 20 내지 40°C의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일간 실시할 수 있다. 보다 구체적으로, 25 내지 35°C의 온도 범위에서 100 내지 150 rpm 조건으로 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.
- [68] 상기 아가로올리고당이 분말상태인 경우 통상의 완충용액에 녹여 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [69] 본 발명은 또한 아가로트리오스, 아가로펜타오스 또는 아가로헵타오스 분해 활성이 있고, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 표시되는 베타-아가로올리고당 가수분해효소(β -agarooligosaccharide hydrolase)를 포함하는 갈락토오스 제조용 조성물에 관한 것이다.
- [70] 본 발명은 또한 기질로 아가로트리오스, 아가로펜타오스 또는 아가로헵타오스를 사용하고, 본 발명의 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 상기 기질을 반응시켜 갈락토오스를 제조하는 방법을 제공한다.
- [71] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 유래일 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다.
- [72] 상기 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 아가로트리오스, 아가로펜타오스 또는 아가로헵타오스를 D-갈락토오스 및 네오아가로바이오스를 제조하므로 D-갈락토오스 제조에 사용할 수 있다.
- [73] 효소 반응은 20 내지 40°C의 온도 범위에서 pH 5 내지 9.6에서 실시할 수 있다.
- [74] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [75] <실시예 1> 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3 조추출액으로부터 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 활성 확인
- [76] 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3가 아가로트리오스를 가수분해하는 효소 활성을 가지고 있는지 확인하기 위해 조추출액을 얻어 활성을 확인하였다.
- [77] 조추출액을 얻기 위해 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3를 해수염을 포함하는 배지에서 대수증식기 중간까지 키운 후 40mL의 배양액을 원심분리한 후 초음파를 이용해 세포를 파쇄하고 조추출액을 얻은 다음 아가다당체를 베타 아가레이즈로 분해하여 얻어진 아가로오스를 기질로 하여 반응분해산물을 TLC를 통하여 관찰하였다(TLC용매 조성: n-butanol:에탄올:물 = 3:1:1).
- [78] 효소별 반응물에 대한 TLC 결과는 도 1에 도시하였고, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스, 네오아가로바이오스 표준물질을 기준으로 하였으며, PA는 3% 아세트산과 130°C에서 30분간 반응시켜 전처리한 아가로오스, PAS는 전처리된 아가로오스에 엑소-타입의 베타 아가레이즈인 Aga50D와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소인 SdNABH를 반응시킨

산물, PASV는 상기 PAS에 추가적으로 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3 조효소액을 반응시킨 산물이다.

- [79] 도 1에 나타난 바와 같이, 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3 조효소액을 추가적으로 반응시켰을 때 아가로트리오스가 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3의 조효소액 내에 아가로트리오스를 가수분해하는 효소가 포함되어 있음을 확인하였다.
- [80] 또한 아가로트리오스를 완전 가수분해하고, 환원당 정량법(DNS법 - 50 μ l의 DNS 시약에 25배 희석한 효소반응물 100 μ l와 혼합하여 95°C에서 5분간 처리 후 540nm에서 흡광도를 측정함)으로 환원당량을 확인하였다.
- [81] 도 2에 나타난 바와 같이, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 갈락토오스의 생산 수율이 상승하는 것을 확인하였다. 전처리만 하였을 때의 당화율은 20% 내외지만 기존의 효소적 전처리를 거쳤을 경우 50%까지 상승하였다. 여기에 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3의 조효소액을 추가적으로 처리했을 시 70%의 당화율을 보였다. 이는 아가로트리오스가 최종적으로 분해된 것에 기인한 것으로 생각되었다.
- [82]
- [83] <실시예 2> 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3의 효소 후보 중 베타-아가로올리고당 가수분해효소 탐색
- [84] 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3에서 보고된 효소 중 아가레이즈와 베타-갈락토시데이즈의 활성을 갖는 것으로 보고된 8개의 효소를 클로닝하여 재조합 균주를 생산한 뒤 각각의 조효소의 아가로트리오스에 대한 활성을 확인하였다. 이 중 아가로트리오스에 대한 가수분해 활성이 있는 효소는 VEJY3_09170 한 가지로 확인되었다. 본 발명자들이 최초로 밝힌 비브리오속(*Vibrio* sp.) EJY3의 전체 게놈 서열 데이터(full genome sequence data)를 바탕으로 UniProt(<http://www.uniprot.org>)를 통해 확인한 결과 VEJY3_09170는 염기서열을 바탕으로 한 분류에서 베타-갈락토시데이즈로 분류되어 있었으며 많은 다른 베타-갈락토시데이즈와 함께 GH family 2에 속하는 효소라는 것을 확인하였다. 이 후 *E. coli* rosetta(DE3)를 재조합 균주의 호스트로 사용하였고 pET-21a를 벡터로 사용했다. 50 μ g/mL의 암피실린 농도의 고체배지에 도말하여 형질전환에 의해 획득한 콜로니를 다시 50 μ g/mL의 암피실린이 함유된 LB(Luria broth)에 접종 후 37°C, 220rpm의 조건으로 12시간 동안 배양하였다(20mL 분량 2개). 그 이후 1L씩의 LB 브로스가 담긴 3L 삼각플라스크 2개에 접종하여 같은 조건에서 3시간(OD=0.8) 진탕배양하고 1시간 동안 얼음에서 식힌 후 0.1mM의 IPTG를 첨가하여 16°C, 120rpm 조건으로 12시간 동안 발현을 유도하였다. 배양액은 원심분리(6000rpm, 4°C, 15분)하여 균체를 회수하였고, 회수한 균체는 20mM 트리스 완충용액(Tris-HCl, 1M NaCl pH8)에 현탁하여 초음파 파쇄기로 파쇄한 후 그 현탁액을 원심분리(16000rpm, 4°C, 60분)하여 상등액을 HisTrap HP column과 HisTrap Q FF column(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여

베타-아가로올리고당 가수분해효소를 분리 정제한 후 8% SDS-PAGE에서 확인하였다.

- [85] 도 3은 정제된 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 SDS-PAGE 사진도로, M은 단백질 마커, 레인 1은 HisTrap HP column을 이용하여 1차 정제된 베타-아가로올리고당 가수분해효소, 레인 2는 HisTrap Q FF column을 이용하여 2차 정제된 베타-아가로올리고당 가수분해효소를 나타낸다.
- [86] 도 3에 나타난 바와 같이, 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 약 90kDa 위치에서 확인되었다.
- [87]
- [88] <실시예 3> 베타-아가로올리고당 가수분해효소 반응 최적조건 확인
- [89] 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 최적조건은 온도와 pH에 국한해서 확인하였다. 기질은 아가로트리오스(Aglyco, Beijing, China)를 사용하였으며 온도는 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50도에서 확인하였고 pH는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10에서 확인하였다.
- [90] 도 4는 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 최적 온도 및 pH 확인 결과로, (a) 아가로트리오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 최적 pH, (b) 아가로트리오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 최적 온도이다.
- [91] 도 4에 나타난 바와 같이, 아가로트리오스에 대한 상대활성이 50%되는 온도는 대략 30-40°C이고, pH 5-9.6 이었다. 최적 효소 활성은 35°C, pH7에서 었다.
- [92]
- [93] <실시예 4> 최적조건에서의 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 생화학적 활성 확인
- [94] 아가로트리오스, 아가로펜타오스, 아가로헵타오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 활성 실험을 실시예 3을 통해 확인한 최적조건인 35°C, pH7의 조건에서 실시하였다.
- [95] 아가로트리오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 반응 시간별 기질 및 생성물의 변화 양상을 확인한 결과, 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 아가로올리고당 한 분자를 네오아가로올리고당과 D-갈락토오스 한 분자로 가수분해 한다는 것을 HPLC(KS-802 column)와 TLC(TLC용매 조건: n-Butanol:EtOH:Water=3:1:1) 분석을 통하여 확인하였다(도 5a).
- [96] 또한, 아가로트리오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응 시간별 기질 및 생성물의 변화 양상을 HPLC로 확인한 결과, 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 조합처리 함으로써 아가로올리고당으로부터 최종적으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스가 생성됨을 확인했다(도 5b).

- [97] 도 6은 아가로트리오스, 아가로펜타오스, 아가로헵타오스 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 활성 확인 결과로, 도 6(a)에 나타난 바와 같이, 베타-아가로올리고당 가수분해효소는 아가로트리오스외에도 아가로헵타오스 및 아가로헵타오스를 분해하여 D-갈락토오스를 생성하였고, 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 조합처리할 경우, 최종적으로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스가 생성됨을 확인했다(도 6b).
- [98]
- [99] <실시에 5> 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 대장균 유래 베타-갈락토시다이즈의 활성 비교
- [100] 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 유래의 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 다른 GH family 2에 속하는 베타-갈락토시다이즈들의 활성을 비교한 결과, 기존에 보고된 베타-갈락토시다이즈와는 다른 활성을 보이며 GH family 2에 속하는 신규한 활성을 가지는 효소임을 확인하였다. 대장균 유래 베타-갈락토시다이즈(Sigma-aldrich, 3050 spruce street, USA)를 각각의 기질에 대해서 활성을 확인하였으며 동일한 기질에 대해서 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 활성을 확인하였다.
- [101] 도 7은 다양한 기질에 대한 베타-아가로올리고당 가수분해효소의 활성을 확인한 결과로, 락토오스(lactose), 락토-N-네오테트라오스(lacto-N-neotetraose), 락토튜블로오스(lactulose), 4-β-갈락토바이오스(4-β-galactobiose), α-1,3-β-1,4-갈락토트리오스(α-1,3-β-1,4-galactotriose)에 대하여 각각 효소 반응 실험을 진행하였고, 그 결과 모든 기질에 대해서 반응성이 없는 것을 확인하였다.
- [102] 도 8은 다양한 기질에 대한 대장균 유래 베타-갈락토시다이즈 가수분해효소의 활성 확인 결과로, 락토오스, 락토-N-네오테트라오스, 락토튜블로오스, 4-β-갈락토바이오스, α-1,3-β-1,4-갈락토트리오스에 대하여 각각 효소 반응 실험을 진행하였고, 이미 알려진 베타-갈락토시다이즈의 활성을 보이는 것을 확인하였다(도 8a). 또한, 아가로트리오스, 아가로펜타오스, 아가로헵타오스에 대하여 각각 효소 반응 실험을 진행한 결과, 대장균 유래 베타-갈락토시다이즈는 아가로올리고당을 가수분해하지 못하는 것을 확인하였다(도 8b).
- [103] 상기 결과를 요약하면, 본 발명은 베타-아가로올리고당 가수분해효소(AOH)를 이용하여 아가로오스 당화 효율을 높일 수 있었고, 이의 당화 과정 모식도는 도 9와 같다.

산업상 이용가능성

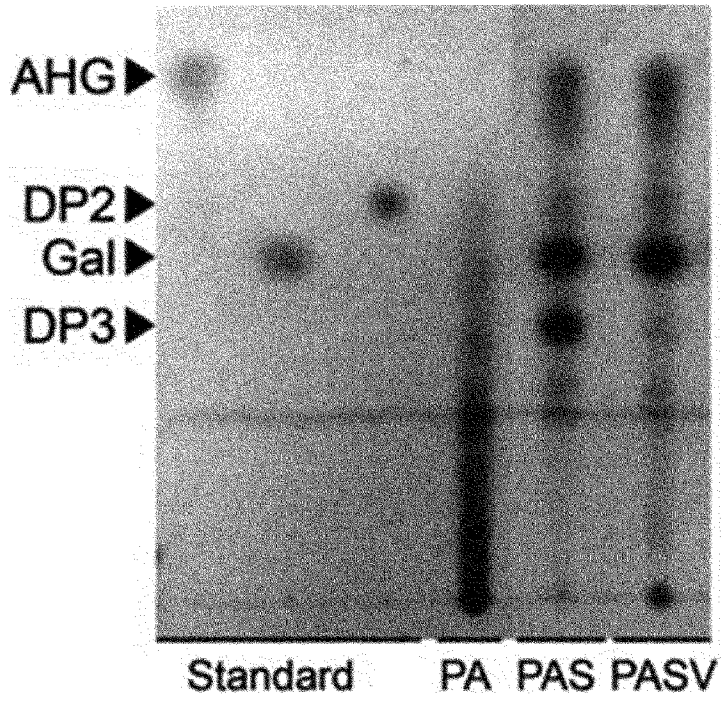
- [104] 본 발명에 따른 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스는 식품, 화장품, 제약 분야에서 유용한 소재로 사용할 수 있다.

청구범위

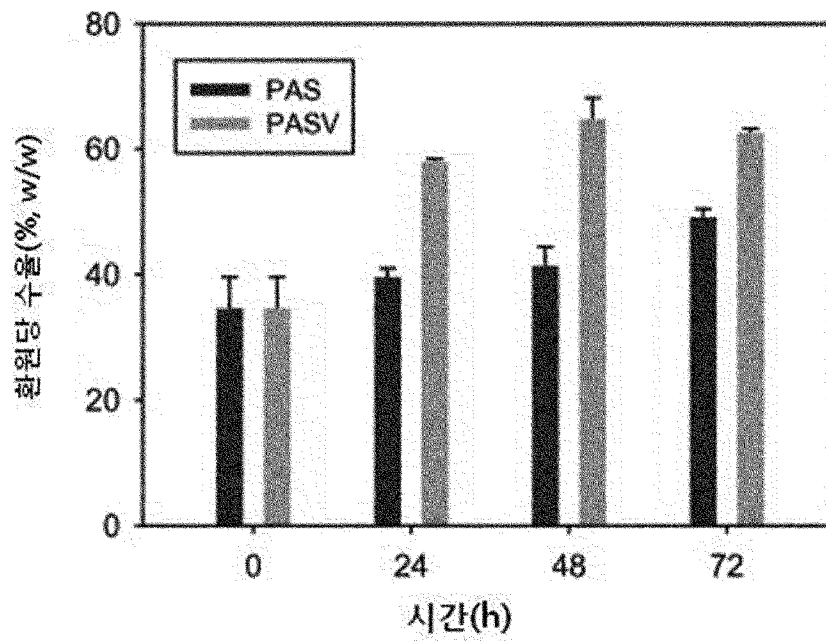
- [청구항 1] 아가로오스 분해효소;
아가로트리오스 분해 활성이 있고, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 표시되는 베타-아가로올리고당 가수분해효소(β -agarooligosaccharide hydrolase); 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 포함하는, 아가로오스 당화용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
아가로오스 분해효소는 SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열로 표시되는 아가로오스 당화용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
베타-아가로올리고당 가수분해효소는 아가로트리오스를 D-갈락토오스 및 네오아가로바이오스로 분해하는 것인 아가로오스 당화용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
베타-아가로올리고당 가수분해효소는 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 유래인 아가로오스 당화용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열로 표시되는 아가로오스 당화용 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 아가로오스 당화용 조성물은 전처리된 아가로오스와, 아가로오스 분해효소, 베타-아가로올리고당 가수분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소의 효소 혼합물을 반응시키거나, 전처리된 아가로오스와, 아가로오스 분해효소, 베타-아가로올리고당 가수분해효소 및 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 순차적으로 반응시켜 아가로오스로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 D-갈락토오스를 제조하는 것인 아가로오스 당화용 조성물.
- [청구항 7] 기질은 아가로오스, 아가로트리오스 및 네오아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택되고, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 아가로오스 당화용 조성물을 상기 기질과 반응시켜 아가로오스를 당화하는 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
반응은 20 내지 40°C의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일간 실시하는 방법.
- [청구항 9] 아가로트리오스, 아가로펜타오스 또는 아가로헵타오스 분해

- 활성이 있고, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열로 표시되는 베타-아가로올리고당 가수분해효소(β -agarooligosaccharide hydrolase)를 포함하는 갈락토오스 제조용 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
베타-아가로올리고당 가수분해효소는 비브리오 속(*Vibrio* sp.) EJY3 유래인 갈락토오스 제조용 조성물.
- [청구항 11] 기질로 아가르트리오스, 아가로펜타오스 또는 아가로헵타오스를 사용하고, 제9항 또는 제10항의 베타-아가로올리고당 가수분해효소와 상기 기질을 반응시켜 갈락토오스를 제조하는 방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
반응은 20 내지 40°C의 온도 범위에서 pH 5 내지 9.6에서 실시하는 방법.

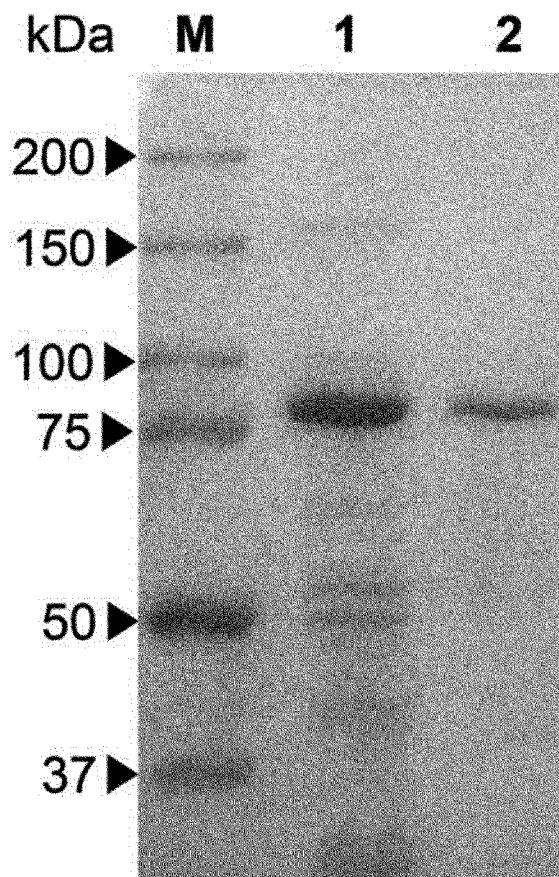
[Fig. 1]



[Fig. 2]

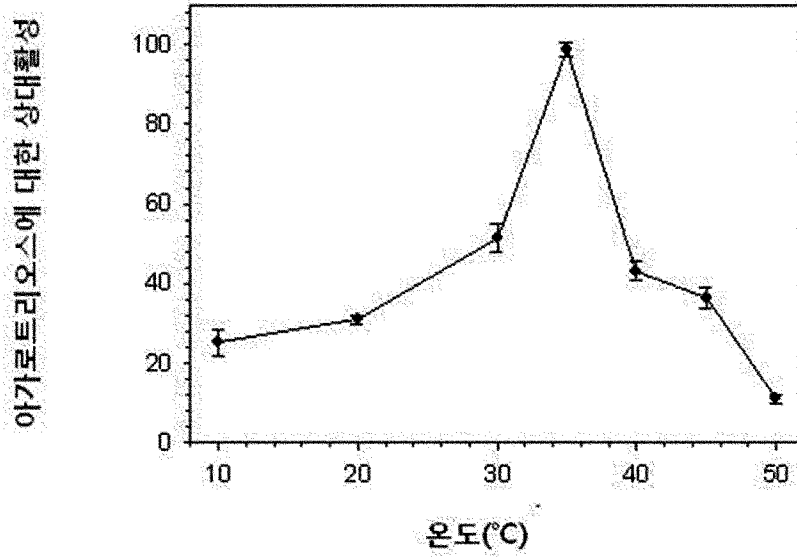


[Fig. 3]

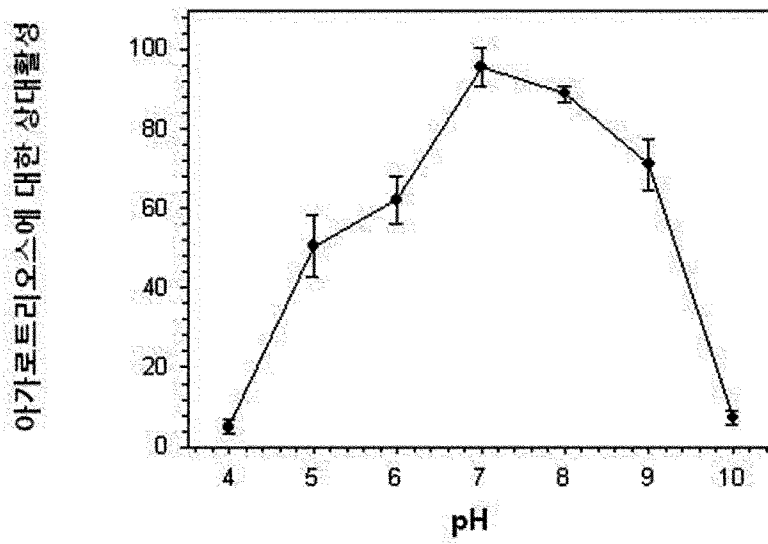


[Fig. 4]

(a)

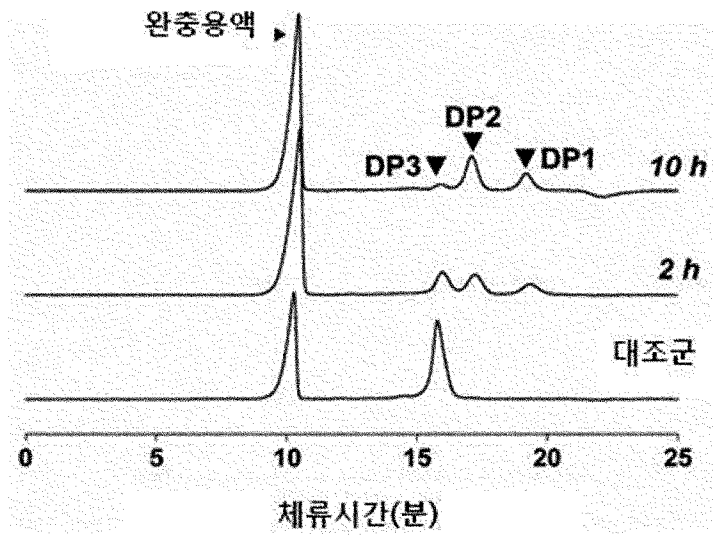


(b)

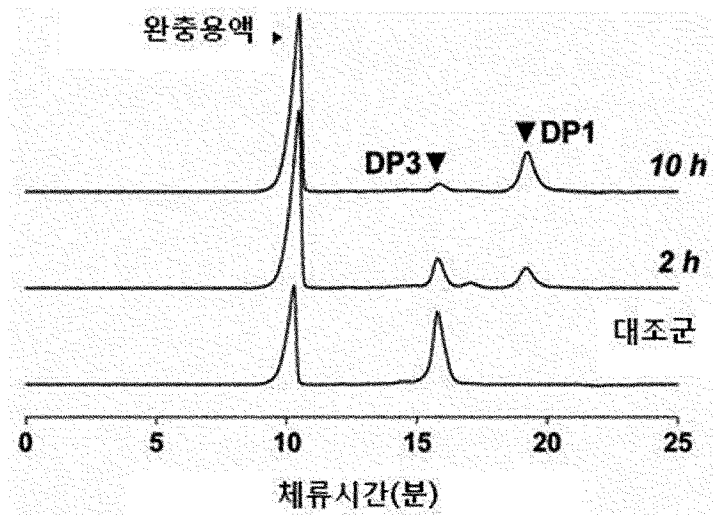


[Fig. 5]

(a)

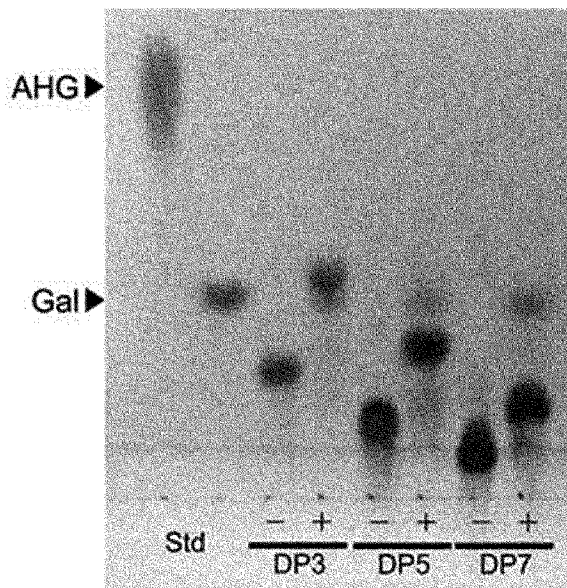


(b)

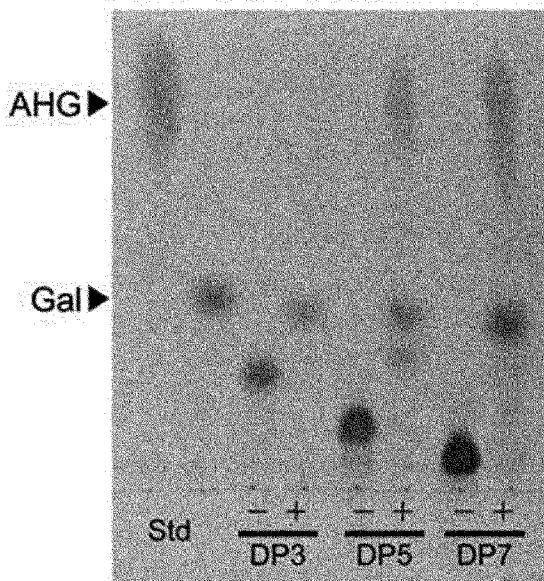


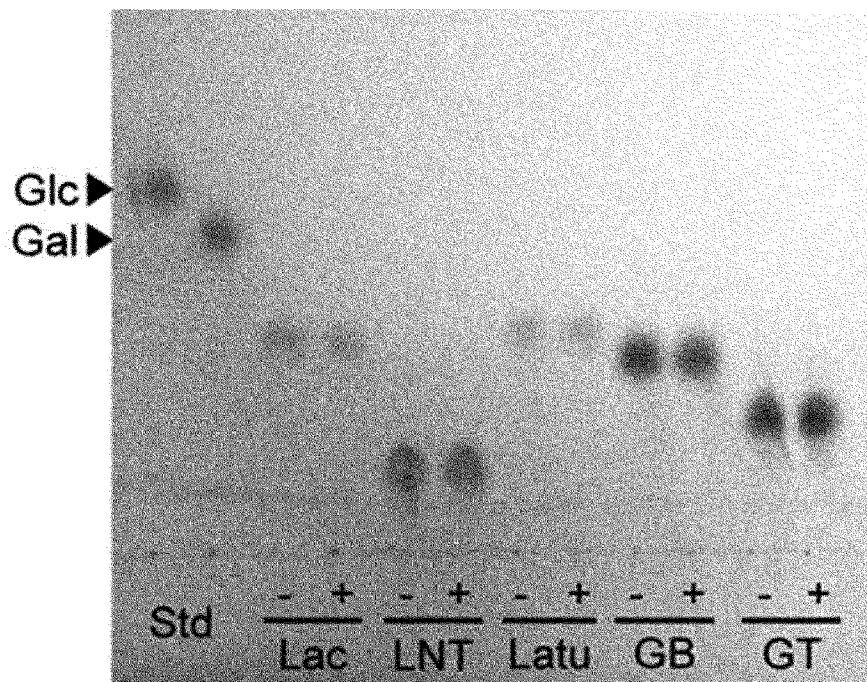
[Fig. 6]

(a)



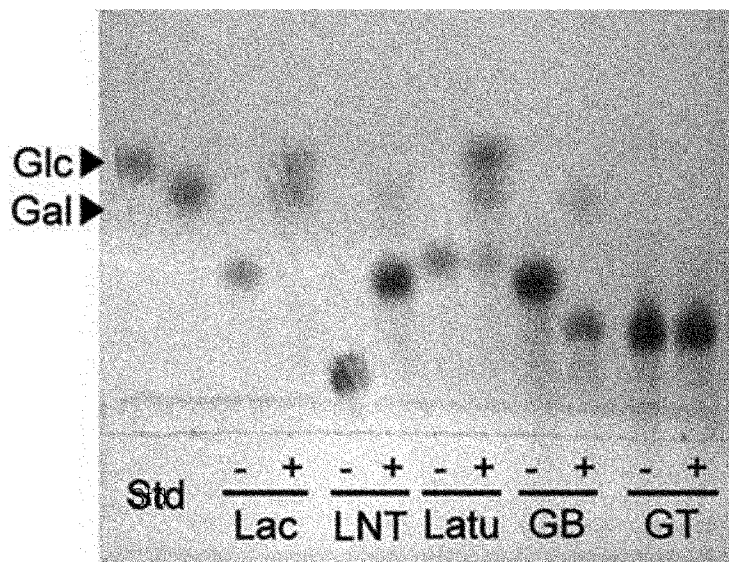
(b)



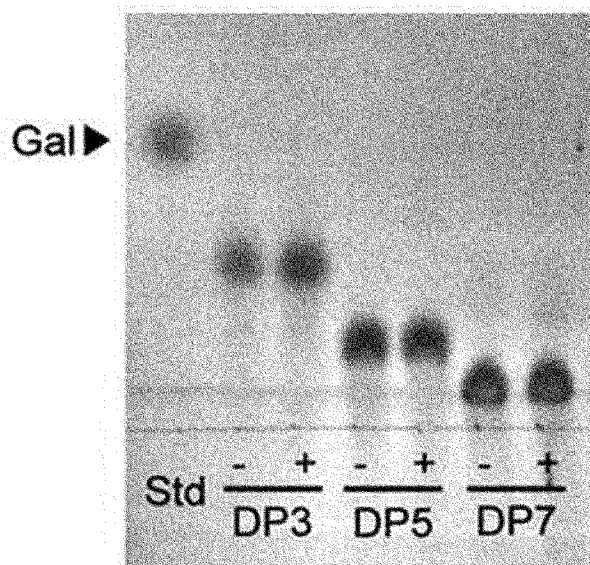


[Fig. 8]

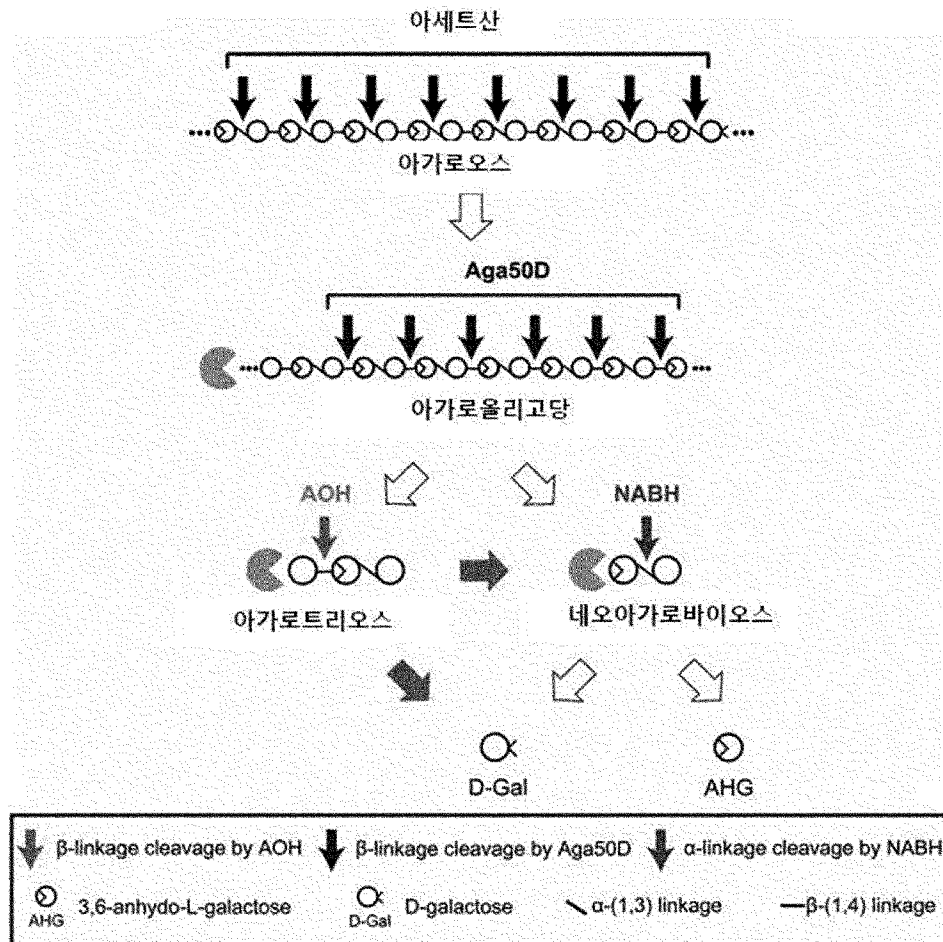
(a)



(b)



[Fig. 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009470**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 9/24(2006.01)i, C12P 19/02(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; C12N 15/56; C12P 19/02

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: agarose, agarotriose, β -agarooligosaccharide, α -neoagarobiose, D-Galactose, β -galactosides, Vibrio, EJY3**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, HEE TAEK et al., "High temperature and low acid pretreatment and agarase treatment of agarose for the production of sugar and ethanol from red seaweed biomass", Bioresource Technology, May 2013, vol. 136, pp. 582-587 See abstract; pages 583-584, 586; figures 2-4; and tables 2-3.	1-12
A	NCBI, NCBI Reference Sequence No. WP_014232195.1 (18 May 2013) See the entire document.	1-12
A	NCBI, PDB No. 4BQ2_A (21 August 2013) See the entire document.	1-12
A	HEHEMANN, JAN-HENDRIK et al., "Biochemical and structural characterization of the complex agarolytic enzyme system from the marine bacterium Zobellia galactanivorans", Journal of Biological Chemistry, 2012, vol. 287, no. 36, pp. 50571-30584 See abstract and pages 30571-30572, 30581-30583.	1-12
A	CHI, Won Jae et al., "Isolation and Characterization of a Novel Agar Degrading Bacterium, Alteromonas macleodii subsp. GNUM08120, from Red Macroalgae", Journal of Microbiology and Biotechnology, March 2013, vol. 41, no. 1, pp. 8-16 See abstract; pages 8-10, 13-15; and figures 3-6.	1-12



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

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"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

12 JANUARY 2015 (12.01.2015)

Date of mailing of the international search report

12 JANUARY 2015 (12.01.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009470

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0115905 A (JEJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 24 October 2011 See abstract; claims 1-5; and paragraphs [0002]-[0038].	1-12
PX	LEE, CHAN HYOUNG et al., "A novel agarolytic β -galactosidase acts on agarooligosaccharides for complete hydrolysis of agarose into monomers", Applied and Environmental Microbiology, Epub. 18 July 2014, vol. 80, no. 19, pp. 5965-5373 See abstract; pages 5965, 5967-5971; figures 1-8; and table 2.	1-12

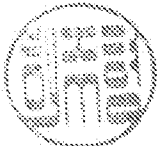
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/009470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0115905 A	24/10/2011	KR 10-1212106 B1	13/12/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/24(2006.01)i, C12P 19/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/24; C12N 15/56; C12P 19/02 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: 아가로스, 아가로트리오스, 베타-아가로올리고당, 알파-네오아가로바이오스, D-갈락토오스, 베타-갈락토시다아제, Vibrio, EJY3		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KIM, HEE TAEK 외 5명, `High temperature and low acid pretreatment and agarase treatment of agarose for the production of sugar and ethanol from red seaweed biomass`, Bioresource Technology, 2013.05., 136권, 페이지 582-587 요약; 페이지 583-584, 586; 도면 2-4; 및 표 2-3 참조.	1-12
A	NCBI, NCBI Reference Sequence No. WP_014232195.1 (2013.05.18.) 전체 문헌 참조.	1-12
A	NCBI, PDB No. 4BQ2_A (2013.08.21.) 전체 문헌 참조.	1-12
A	HEHEMANN, JAN-HENDRIK 외 8명, `Biochemical and structural characterization of the complex agarolytic enzyme system from the marine bacterium Zobellia galactanivorans`, Journal of Biological Chemistry, 2012, 287권, 36호, 페이지 50571-30584 요약 및 페이지 30571-30572, 30581-30583 참조.	1-12
A	지원재 외 6명, `홍조류로부터 신규 한천분해미생물 Alteromonas macleodii subsp. GNUM08120 의 분리 및 동정`, 한국미생물·생명공학회지, 2013.03., 41권, 1호, 페이지 8-16 요약; 페이지 8-10, 13-15; 및 도면 3-6 참조.	1-12
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌 “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 2015년 01월 12일 (12.01.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 01월 12일 (12.01.2015)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 3473		심사관 허주형 전화번호 ++82-42-481-8150 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0115905 A (제주대학교 산학협력단) 2011.10.24. 요약; 청구항 제1항-제5항; 및 문단 [0002]-[0038] 참조.	1-12
PX	LEE, CHAN HYOUNG 외 7명, `A novel agarolytic $\beta$ -galactosidase acts on agarooligosaccharides for complete hydrolysis of agarose into monomers`, Applied and Environmental Microbiology, Epub. 2014.07.18., 80권, 19호, 페이지 5965-5373 요약; 페이지 5965, 5967-5971; 도면 1-8; 및 표 2 참조.	1-12

국제출원번호
PCT/KR2014/009470

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0115905 A	2011/10/24	KR 10-1212106 B1	2012/12/13