

관 인 생 략

# 출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2014.12.19

특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(265)

출 원 번 호 10-2014-0184661 (접수번호 1-1-2014-1237947-13)

출 원 인 명 칭 서울대학교산학협력단(1-2007-050924-2)

대 리 인 성 명 이처영(9-2003-000118-9)

발 명 자 성 명 서진호 진영욱 김지영

발 명 의 명 칭 2-푸코실락토오스 생산 변이 미생물 및 이를 이용한 2-푸코실락토오스의 제조방법

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

## 【명세서】

### 【발명의 명칭】

2-푸코실락토오스 생산 변이 미생물 및 이를 이용한 2-푸코실락토오스의 제조방법 {Variant Microorganism for Producing 2-Fucosyllactose and Method of Producing 2-Fucosyllactose by Using the Same}

### 【기술분야】

<0001> 본 발명은 2-푸코실락토오스 생산 변이 미생물 및 이를 이용한 2-푸코실락토오스의 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 *lacZ* 변형 오페론을 도입시킨 미생물에  $\alpha$ -1,2 푸코오스 전이효소 ( $\alpha$ -1,2 fucosyltransferase), 이의 변이체를 코딩하는 외래 유전자, G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 GSK (guanosine-inosine kinase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상이 도입 또는 증폭되어 있는 변이 미생물 및 이를 이용하여 2-푸코실락토오스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

### 【발명의 배경이 되는 기술】

<0002> 사람의 모유에는 200여종 이상의 독특한 구조를 가지는 올리고당 (human milk oligosaccharides, HMO)이 다른 포유류의 젖에 비해 상당히 높은 농도 (5~15 g/L)로 존재한다. HMO는 장내 유산균의 생육을 돕는 프리바이오틱 (prebiotic) 효과, 병원균 감염 예방 및 면역시스템 조절과 같이 사람의 건강에 영향을 미치는 다양한 생물학적 활성을 제공하는 기능성을 가지고 있다.

<0003> HMO는 D-glucose (Glc), D-galactose (Gal), N-acetylglucosamine (GlcNAc),



L-fucose (Fuc)와 sialic acid (Sia; N-acetyl neuraminic acid [Neu5Ac])로 구성되어 있다. HMO의 구조는 매우 다양하고 복잡하여 다른 잔기와 글리코실 결합을 가지는 200개 정도의 이성질체가 서로 다른 중합도(DP 3-20)를 가질 수 있다. 구조적 복잡성에도 불구하고, HMO는 몇 가지 공통적인 구조를 가진다. 대부분의 HMO는 환원말단에 락토오스 ( $\text{Gal } \beta 1-4\text{Glc}$ ) 잔기를 가진다. 락토오스의 Gal은  $\alpha$ -(2,3)-과  $\alpha$ -(2,6)-결합으로 각각 3-시알릴락토오스 (3-sialyllactose) 또는 6-시알릴락토오스 (6-sialyllactose)의 형태로 시알화되거나,  $\alpha$ -(1,2)-과  $\alpha$ -(1,3)-결합으로 각각 2-푸코실락토오스(2'-fucosyllactose) 또는 3-푸코실락토오스(3'-fucosyllactose)의 형태로 푸코실화 (fucosylation) 될 수 있다 (도 1). 약 200개의 다른 복합 올리고당이 모유에서 발견되었는데, 가장 함량이 많은 올리고당 3가지를 포함하여 137개가 푸코실화되어 그 비율은 거의 77%이고, 남은 올리고당은 대부분 시알화된 것(39개)으로 약 28%에 해당한다. 이 중, 특히 2-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)는 앞서 언급한 다양한 생물학적 활성화에 관여하는 주요 HMO인 것으로 보고되었으며, 모유에 함유된 올리고당 중에 가장 풍부한 것으로 알려져 유아용 분유 및 노인용 건강기능식품의 소재 및 의약품의 소재로의 이용가능성으로 주목을 받게 되었다. 그러나 현재 2-푸코실락토오스는 산업적으로 대량생산이 어렵기 때문에, 2-푸코실락토오스를 대신하여 갈락토올리고당 (galactooligosaccharide) 또는 프럭토올리고당 (fructooligosaccharide)을 이유식에 첨가하여 유사한 효과를 기대하고 있는 실정이다.

2-푸코실락토오스의 생산방법으로는 직접 모유로부터 추출하는 방법과 화학



적 또는 효소적 방법으로 합성하는 방법이 있다. 하지만 직접 추출하는 방법은 모유수급의 한계와 낮은 생산성이 문제였고, 화학적 합성법은 고가의 기질, 낮은 이성체 선택성(stereo-selectivity)과 생산수율, 독성시약의 사용 등의 문제가 있었다. 또한 효소적 합성법은 푸코스의 공여체(donor)로 이용되는 GDP-l-fucose가 매우 고가라는 점과 푸코스전이효소의 정제비용이 많이 든다는 문제점이 있었다. 따라서 이러한 문제들로 인해 직접추출, 화학적 또는 효소적 생산법은 산업적 대량생산에 적용이 불가능하였다. 반면, 미생물을 이용한 생물공학적인 생산방법은 단순한 공정을 통해 값싼 기질로부터 2-푸코실락토오스를 대량으로 생산이 가능하다는 측면에서, 화학적 합성이나 효소적 합성과 같은 다른 시스템에 비해 산업적 대량생산에 적합하기 때문에 각광받고 있다.

<0005> HMO를 생산하기 위해 자연에서 분리하거나, 화학적으로 합성하고자 하는 시도가 있었으나, 제한된 자원량과 화학 합성의 내재된 문제들로 인해 성공적이지 않았다. 이를 극복하고자, 미생물을 이용한 생물공학적인 생산기술이 개발되었으며, 단순한 공정으로 대량생산이 가능하다는 측면에서, 화학적 합성이나 효소적 합성과 같은 다른 시스템에 비해 더 우수하다는 평가를 받는다.

<0006> 미생물을 이용한 HMO 생산과 관련된 이전 연구에서, 콜라닌산 (colanic acid) 생합성에 대한 양성 조절자 RcsA를 과발현시키고, 콜라닌산 생합성을 위해 GDP-L-fucose를 이용하는 효소인 WcaJ를 불성활성시킴으로써, 설계된 *E. coli*의 세포외에서 2-푸코실락토오스를 생산하려는 시도가 있었다. 그러나, 2-푸코실락토오스의 생산 농도 및 생산성이 낮다는 문제가 있었다.



<0007>

이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 종래와 달리, *lacZ* 변형 오페론 도입;  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase 또는 이의 변이체를 코딩하는 유전자 및 G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase)를 코딩하는 유전자 및 GSK (guanosine-inosine kinase)를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 변이 미생물을 이용함으로써 높은 수율로 2-푸코실락토오스를 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

<0008>

본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

**【발명의 내용】**

**【해결하고자 하는 과제】**

<0009>

기존에 개발된 재조합 대장균으로 2-푸코실락토오스(2-Fucosyllactose, 2-FL)를 생산하는 데에는 두 가지 문제점이 있었다. 첫번째는 모균주로 *E. coli* JM109등의 K-12계열의 균주들을 이용하는데, 이 균주들은 고농도 세포배양을 하기 어렵다는 점이고, 두번째는 기존 연구에서 이용되었던 *Helicobacter pylori* 유래의 1,2-fucosyltransferase는 과발현시 inclusion body를 형성하기 때문에 역가가 제한적이라는 점이다. 본 발명의 목적은 이러한 기존기술의 문제점을 인식하고, HMO를 효율적으로 생산하면서도 최종농도, 수율 및 생산성을 개선시킬 수 있는 변이 미생물 및 이를 이용하여 HMO를 제조하는 방법을 제공하는데 있다. 또한, 고농



도 세포배양 및 푸코스 전이효소의 발현수준향상을 통하여 최종적으로 2-푸코실락토스를 기존기술보다 고농도로 생산할 수 있는 기술을 개발하여 제공하고자 한다.

### 【과제의 해결 수단】

<0010>       상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 2-푸코실락토오스 (2-Fucosyllactose, 2-FL)를 생산하는 대사회로를 가지는 미생물에서, (a) 내인성 *lac* 오페론이 제거되고, *lacZΔM15* 오페론이 도입; 및 (b)  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase 또는 이의 변이체, (c) G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 (d) GSK (guanosine-inosine kinase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 하는 변이 미생물에 관한 것이다.

<0011>       상기 변이체는  $\alpha$ -1,2 fucosyltransferase의 N-말단에 아스파테이트(aspartate) 반복서열 또는 infB (translation initiation factor)의 1~7번째 아미노산을 코딩하는 유전자를 태그로 결합시킨 것일 수 있다.

<0012>       본 발명은 상기 변이 미생물을 배양하여 2-FL을 생성시킨 다음, 배양액으로부터 2-FL을 회수하는 것을 특징으로 하는 2-FL의 제조방법에 관한 것이다.

### 【발명의 효과】

<0013>       본 발명에 따른 변이 미생물 및 이를 이용한 제조방법에 따르면, 생산 수율이 낮아 산업적 측면에서 적용이 불가능하던 종래기술의 제약을 극복하고, 매우 우수한 수율로 락토오스로부터 2-FL을 생산할 수 있다. 이를 통해 산업화를 위한 대



량 생산을 용이하게 함으로써, 식품 또는 제약 산업에 적합하게 적용할 수 있다.

### 【도면의 간단한 설명】

<0014>

도 1은 2'-푸코실락토오스의 구조적 조성을 나타낸 것이다.

도 2는 재조합 대장균에서 GDP-L-fucose 및 2-FL을 생합성 하기 위한 de novo 대사 경로를 나타낸 것이다.

도 3은 *lac* 오페론을 조작한 재조합 대장균 균주를 구축하기 위한 모식도이다[(a) 야생형 대장균 - BL21star(DE3), (b) *lac* 오페론을 제거한 대장균 -  $\Delta$ L, (c) *lac* $\Delta$ M15를 도입한 대장균 -  $\Delta$ L M15].

도 4는 재조합 대장균 균주들의 회분배양 결과를 나타낸 것으로, 광학밀도(OD<sub>600</sub>)가 약 0.5~0.8에 도달하면, IPTG와 락토오스를 최종 농도가 각각 0.1mM 및 20 g/L(수직선)이 되도록 첨가하였다: (a) BL21star(DE3) BCGW-F, (b)  $\Delta$ L BCGW-F, (c)  $\Delta$ L M15 BCGW-F. 그래프 중 기호는 다음과 같으며, 도 4 중 기호는 3개의 독립적 회분배양의 대표값을 나타낸다: ●: 건조세포중량, ■: 락토오스, ▲: 2-푸코실락토오스.

도 5는 재조합 대장균 균주들의 유가식 배양결과를 나타낸 것으로, 초기에 투입한 20 g/L 글리세롤이 모두 소모된 후, 글리세롤을 pH-stat으로 공급하기 시작하였고, IPTG와 락토오스를 동시에 추가하였다(큰 화살표). 락토오스 고갈 후 200 g/L 락토오스 용액을 추가로 투입하였고(작은 화살표), 건조 세포 중량이 약 60에



도달한 후 글리세롤 공급 모드를 수동 모드로 변경하였다 (수직선). (a)  $\Delta$ L M15 BCGW-F, (b) BCGW-Fz, (c) BCGW-Fg, (d) BCGW-D3F, (e) BCGW-infBF, (f) BCGW-W 도 6 중 기호는 다음과 같다: ●: 건조세포중량, ■: 락토오스, ▲: 2-FL, ◆: 글리세롤.

도 6은  $\Delta$ L M15/pmBCGW+pHwcfB의 배양액을 LC-MS/MS분석을 통해 2-푸코실락토오스의 생산을 확인한 결과이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

<0015> 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

<0016> 본 발명은 일 관점에서, 2-푸코실락토오스 (2-Fucosyllactose, 2-FL)를 생산하는 대사회로를 가지는 미생물에서, (a) 내인성 *lac* 오페론이 제거되고, *lacZ*  $\Delta$  M15 오페론이 도입; 및 (b)  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase 또는 이의 변이체, (c) G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 (d) GSK (guanosine-inosine kinase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 하는 변이 미생물에 관한 것이다.

<0017> 고농도 배양 및 외래단백질 발현에 적합한 대장균인 BL21star(DE3)를 2-푸코실락토오스 생산용 균주로 이용하기 위하여 락토오스분해효소 ( $\beta$ -galactosidase, LacZ)의 역가를 감소시킨 BL21star(DE3) 균주를 구축하였다. 이를 위해 (a) 야생형





BL21star(DE3)의 내인성 *lac* 오페론을 파쇄하고, *lacZΔM15*이 포함된 변이 *lac* 오페론을 도입하여 락토오스분해효소 ( $\beta$ -galactosidase)의 역가를 크게 감소시킴으로써 세포 내로 들어온 대부분의 락토오스(lactose)가 세포생장이 아닌 2-푸코실락토오스의 생산에 이용되도록 대사의 흐름을 전환시켰다.

<0018>

(b) GDP-L-fucose 생합성 효소를 코딩하는 유전자(*gmd*, *wcaG*, *manB*, *manC*) 및  $\alpha$ -1,2 fucosyltransferase를 코딩하는 유전자(*fucT2* 또는 *wcfB*)를 도입하거나, 이의 변이체 예를 들어  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소의 푸코실화 활성도를 향상시키기 위해 N-말단에 아스파테이트 (aspartate) 반복서열 또는 *infB* (translation initiation factor)의 1~7번째 아미노산을 태그형태로 결합시켜 도입할 수 있다.

<0019>

(c) GDP-l-fucose 생합성 효소를 코딩하는 유전자(*gmd*, *wcaG*, *manB*, *manC*)를 과발현시키고, G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및/또는 Gsk (guanosine-inosine kinase)를 코딩하는 유전자(*zwf*, *gsk*)를 도입시킴으로써 푸코스의 공여체인 GDP-l-fucose의 공급을 향상시킬 수 있다.

<0020>

또한, (d) 기존의 *H. pylori* 유래의  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소보다 활성형으로 발현이 잘되는 *Bacteroides fragilis* 유래의  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소를 코딩하는 유전자(*wcfB*)를 발굴 및 도입시킨 재조합 대장균을 구축할 수 있다.

<0021>

상기 2-푸코실락토오스를 생산하는 대사회로를 가지는 미생물은 박테리아일 수 있으며, 바람직하게 *E. coli* BL21star (DE3)일 수 있다. 종래 JM107 및 JM109 (*E. coli* K-12 변이체)과 같은 JM 균주는 높은 세포 밀도에서 자라면 생산물 형성 비율을 증가시키기 위해 세포 성장이 억제될 수 있다. 세포 성장 억제는 높은 수준



의 아세테이트 축적에 의해 유발되는 것으로 판단된다. JM 균주에 반해, *E. coli* BL21 균주는 활발한 당 대사로 인해 세포 성장도 빠르고, 아세테이트 축적량도 적으며, 글루코스 이용률이 더 우수하다는 장점이 있다. 또한, BL21 균주는 다량의 재조합 단백질을 생산함에 있어 야기되는 대사 스트레스에 덜 민감하다. 종래 BL21star (DE3)에서 2-FL 생산을 시도하여 세포 내에 GDP-1-fucose가 축적되었으나, 2-FL을 생산하는 대신 락토오스를 동화시킴으로써, 미량의 2-FL만을 생산하였다. 이는 야생형 BL21star(DE3)의 락토오스 분해효소( $\beta$ -galactosidase)의 활성도가 너무 높았기 때문인 것으로 사료되었기에 본 발명에서는 락토오스의 대사흐름이 세포성장 쪽으로 가기 보다는 2-푸코실락토오스의 생산에 이용되게 하기 위해서 *lac* 오페론의 교체를 통하여 락토오스 분해효소( $\beta$ -galactosidase)의 활성을 기존 효소에 비해 3% 수준까지 저하시켰다.

<0022>

본 발명에 따른 변이 미생물은 (a) 내인성 *lac* 오페론이 제거되고, *lacZ* $\Delta$ *M15*를 포함하는 *lac* 오페론이 도입되어 있다. 명세서에서 사용되는 "*lacZ* $\Delta$ *M15*"는  $\beta$ -galactosidase 코딩 유전자 (*lacZ*)의 11~42번째 아미노산 부분(93 bp 길이의 염기서열)이 결실된 유전자를 의미한다.

<0023>

상기 *lacZ* $\Delta$ *M15*를 포함하는 *lac* 오페론은 *E. coli* K-12 균주 유래, 예를 들어 *E. coli* JM109 유래일 수 있는데, 본 출원의 발명자들은 *E. coli* JM109 균주가 락토오스만을 흡수할 뿐 동화시키지 않음을 확인하고, 미생물 내의 내인성 *lac* 오페론을 *E. coli* JM109 유래 *lacZ* $\Delta$ *M15*를 포함하는 *lac* 오페론으로 교체한 결과, 야생형 균주에 비해, 2-FL 생산 수율이 약 3배 이상 향상될 수 있음을 확인하였다.



락토오스 동화 속도를 늦춘 본 발명에 따른 변이미생물 제작 결과, 내인성 *lac* 오페론을 *lacZΔM15*을 포함하는 *lac* 오페론으로 교체하는 것이 2-푸코실락토오스 생산에 효과적임을 확인하였다.

<0024> 본 발명에 따른 변이 미생물에는 또한, (b) α-1,2 fucosyltransferase를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있다. 상기 유전자는 예를 들어, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis*, *Dyadobacter fermentans*, *Enterococcus faecium* DO, *Escherichia coli* 0128:B12, *Helicobacter hepaticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, *Silicibacter pomeroyi*, *Pedobacter heparinus* 또는 *Pedobacter saltans* 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 최종 산물인 2-푸코실락토오스 생산에 적합한 활성도를 고려하여, 바람직하게 *Helicobacter pylori* 유래의 *fucT2* 또는 *Bacteroides fragilis* 유래의 *wcfB* 유전자가 도입 또는 증폭될 수 있다.

<0025> 선행연구에서는 *Candida antarctica* 유래의 리파아제(lipase)를 대장균에서 발현시킬 시에 insoluble하게 발현되어 활성도가 낮은 문제가 있었는데, 말단부위에 1~10개의 비교적 짧은 아미노산을 태그형태로 부착시키면 단백질의 활성도를 향상시키는데 효과가 있다고 보고한 바 있다[Jung *et al.* (2011) Bioprocess and biosystems engineering]. 또한, 다른 그룹의 선행연구에 따르면, translation initiation factor II를 코딩하는 *infB* 유전자의 1~21번째 서열을 Green fluorescent protein (GFP) N-말단에 부착하였을 경우, 활성도가 향상된다고 보고한 바 있다 [Hansted *et al.* (2011) Journal of biotechnology 155(3):275-283]. 본 발명에서



는 2-푸코실락토오스의 생산에 관한 선행연구들에서 발현에 문제가 있었던 *H. pylori* 유래의  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소에 아미노산 태그를 부착시키는 방법을 적용하였다. 하나의 실시예에서, 상기 변이체는  $\alpha$ -1,2 fucosyltransferase의 N-말단에 아스파테이트(aspartate) 반복서열 또는 infB (translation initiation factor)의 1~7번째 아미노산을 코딩하는 유전자를 태그로 결합시킨 것일 수 있다.

<0026> 본 발명에 따른 변이 미생물은 (c) G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및/또는 GSK (guanosine-inosine kinase)를 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있다. 본 출원의 발명자들은 상기 G6PDH를 코딩하는 유전자인 *zwf* 및/또는 GSK를 코딩하는 유전자 *gsk*가 도입 또는 증폭된 변이 미생물은 2-푸코실락토오스 생산에 효과적임을 확인하였다.

<0027> 상기 *zwf* 유전자는 예를 들어, *Escherichia coli* (strain K-12), *Escherichia coli* 0157:H7, *Escherichia coli* 06:H1, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nostoc* sp., *Mycobacterium smegmatis*, *Rhizobium meliloti*, *Streptococcus pneumoniae* serotype 4, *Zymomonas mobilis* subsp. *Mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Chlamydia pneumonia*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Arabidopsis thaliana*, *Synechococcus elongates*, *Dickeya dadantii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Borrelia burgdorferi*, *Buchnera aphidicola* subsp. *Acyrtosiphon pisum*, *Buchnera aphidicola* subsp. *Schizaphis graminum*, *Buchnera aphidicola* subsp. *Baizongia pistaciae*,



*Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenza*, *Nostoc punctiforme*, *Synechocystis sp.*, *Thermotoga maritime*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Bacillus thuringiensis*, *Solanum tuberosum*, *Takifugu rubripes*, 또는 *Macropus robustus* 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게 *Escherichia coli* K-12 유래일 수 있다.

<0028> 상기 *gsk* 유전자는 예를 들어, *Escherichia coli* (strain K12), *Escherichia coli* 0157:H7, *Escherichia coli* 06:H1, *Exiguobacterium acetylicum* 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게 *Escherichia coli* K-12 유래일 수 있다.

<0029> 1-푸코오스는 HMO와 진핵생물의 당단백질 및 당지질의 글리코실화 잔기에 존재하는 당으로, 다양한 유형의 생화학적 인식 과정에서 중요한 역할을 한다. 푸코실락토오스를 생합성하기 위해서는 1-푸코오스가 공여체인 GDP-푸코오스를 통하여 수용체인 락토오스에 당전이시키는 반응을 거친다. 이러한 푸코실락토오스를 생합성하는 경로는 2가지로, salvage 생합성 경로 및 de novo 생합성 경로가 있다.

<0030> Salvage 합성법은 1-푸코오스가 세포내부에서 ATP를 소비하면서 1-fucose kinase (fkp)에 의해 인산화되어 1-fucose-1-phosphate가 되고, 1-fucose-1-phosphate guanylyl-transferase에 의해 guanosine triphosphate (GTP)와 함께 결합하여 GDP-fucose가 된 후 푸코스전이효소를 통해 락토오스로부터 푸코실락토오스를 생산한다.



<0031> De novo 합성법은 해당작용의 중간체인 fructose-6-phosphate가 mannose-6-phosphate isomerase (ManA)와 phosphomannomutase (ManB)에 의해 mannose-1-phosphate로 대사되고, mannose-1-phosphate guanyltransferase (ManC)에 의해 GTP와 함께 결합하여 GDP-d-mannose를 형성한다. 이후, GDP-d-mannose 4,6-dehydratase (Gmd)는 GDP-d-mannose로부터 물 분자를 제거하고 GDP-1-fucose synthase (WcaG)은 GDP-4-keto-6-deoxymannose의 C4 위치에 있는 keto 그룹의 환원을 촉진하고 여기에 환원된 NADPH는 환원력을 제공하여 GDP-1-fucose가 제조된 후 fucosyltransferase를 통해 락토오스로부터 푸코실락토오스를 생산한다 (도 3).

<0032> 이와 관련하여, 본 발명에 따른 변이 미생물은 de novo 생합성 경로를 거쳐 푸코실락토오스를 합성할 수 있다. 이에 따라, 도 3에 나타낸 바와 같이 ManA (mannose-6-phosphate isomerase), ManB (phosphomannomutase), ManC (mannose-1-phosphate guanyltransferase), Gmd (GDP-d-mannose dehydratase) 및 WcaG (Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 효소를 코딩하는 유전자가 추가로 도입 또는 증폭될 수 있다.

<0033> 본 발명에 따른 변이 미생물에 도입되는 재조합 벡터 (플라스미드)는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, 플라스미드와 혼용될 수 있다. 상기 플라스미드는 예를 들어, (a) 내지 (c)의 유전자 및 *manA*, *manB*, *manC*, *gmd*, *wcaG* 유전자를 포함하며, 예를 들어 pGRG36+*lacZ*Δ*M15*, pETDuet-1 + *manC*-*manB* + *gmd*-*wcaG*, pCOLADuet-1 + *fucT2*, pCOLADuet-1 + *fucT2* + *zwf*, pCOLADuet-1 + *fucT2* + *gsk*, pCOLADuet-1 + D3*fucT2*, pCOLADuet-1 + *infBfucT2* 또는 pCOLADuet-



1 + *wcfB* 벡터일 수 있다.

<0034>

상기 재조합 벡터 (플라스미드)는 프로모터 및 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "프로모터"는 특정한 재조합 미생물에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 프로모터로는 모든 시간대에 상시적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터(constitutive promoter) 또는 특정한 위치, 시기에 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터(inducible promoter)를 제한없이 사용할 수 있다. 상기 프로모터는 재조합 미생물에 천연, 동종, 외래 또는 이중일 수 있다.

<0035>

"작동 가능하게 연결된"은 2개 이상의 성분의 병렬을 지칭하고, 이 때 상기 성분은 의도된 방식으로 작용하도록 하는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터가 연결된 서열의 전사를 제어하거나 조절하도록 작용하는 경우, 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 상기 작동 가능하게 연결된 DNA 서열은 인접하고, 이 때 분비 리더/신호 서열 및 인접하고 리딩 프레임 내에 있는 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 2개 이상을 접합시킬 수 있다.

<0036>

본 명세서에서 사용되는 "도입"은 원형질체 제작과 세포벽 재생산이 후속되는 원형질체의 형질전환과 관련된 과정에 의하여 수행된 것일 수 있다. 원형질체 내에 삽입된 DNA는 숙주세포의 염색체 안으로 삽입된다. 삽입된 DNA 서열은 세포 내에서 안정하게 유지된다. DNA는 통상적으로 염색체 내 상동성, 비상동성 부위로 삽입될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 "증폭"은 DNA 서열의 카피수를 증



가시킴을 위한 과정을 의미하며, 예를 들어 증폭은 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 통해 수행될 수 있다.

<0037> 본 발명은 다른 관점에서, 상기 변이 미생물을 배양하여 2-푸코실락토오스를 생성시킨 다음, 배양액으로부터 2-푸코실락토오스를 회수하는 것을 특징으로 하는 2-푸코실락토오스의 제조방법에 관한 것이다.

<0038> 본 발명에 있어서, 변이 미생물의 배양 및 회수과정은 통상적으로 알려진 배양방법을 사용하여 수행될 수 있으며, 본 발명의 실시예에서 사용된 특정 배지 및 특정 배양방법 이외에도 타 성분의 배지를 사용할 수 있고, 글리세롤과 락토오스를 함께 이용한 유가식 배양 (fed-batch fermentation), 회분식 배양 (batch fermentation), 또는 연속식 배양 등 다양한 방법을 사용할 수 있다. 글리세롤과 락토오스는 동시에 이용될 수 있는데, 이는 두 가지 당이 비당류 인산화를 촉매하는 시스템 (non-phosphotransferase system)을 통해 세포 내로 운반되기 때문이다. GDP-1-fucose의 생합성 뿐 아니라, 세포 성장을 위해 락토오스를 추가하여 글리세롤 유가배양을 실시할 수 있다. 이를 통해 아세테이트 축적을 방지하면서도, 글리세롤과 락토오스의 동시 동화를 통해 세포 성장이 유지되면서 2-푸코실락토오스의 생산성 역시 개선될 수 있다.

### <0039> 실시예

<0040> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에

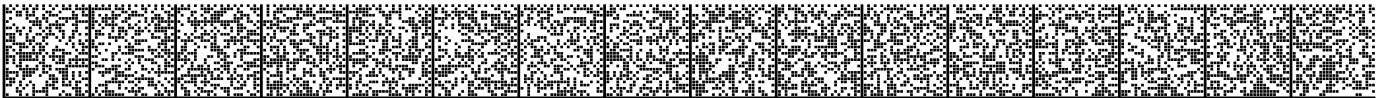




의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<0041> [실시예 1] 재조합 균주 및 플라스미드 제작

<0042> 유전자 조작 및 2-푸코실락토오스 생산을 위해 *E. coli* TOP10 및 *E. coli* BL21star(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 각각 사용하였다. GDP-1-fucose 생합성 효소 (ManB, ManC, Gmd 및 WcaG) 및 *Helicobacter pylori* 유래  $\alpha$ -1,2 푸코오스 전이효소( $\alpha$ -1,2 fucosyltransferase: FucT2)의 과발현을 위해 플라스미드 pmBCGW 및 pHfucT2를 각각 이용하였다. G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 또는 GSK (guanosine-inosine kinase)를 추가로 발현시키기 위해 pHfucT2zwf와 pHfucT2gsk를 제작하였고, *H. pylori* 유래의  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소의 N-말단에 아스파테이트(aspartate) 반복서열 또는 *infB* (translation initiation factor)의 1~7번째 아미노산을 태그형태로 결합시키기 위해 pH3fucT2와 pHinfBfucT2를 제작하였으며, 신규  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소인 *Bacteroides fragilis* 유래의 WcfB의 과발현을 위해 플라스미드 pHwcfB를 제작하였다. 실시예 중 사용된 유전자 서열은 다음 표 1과 같다.



<0043> [표 1]

유전자명	서열번호
<i>gmd</i>	서열번호 1
<i>wcaG</i>	서열번호 2
<i>manC</i>	서열번호 3
<i>manB</i>	서열번호 4
<i>fucT2</i>	서열번호 5
<i>D3fucT2</i>	서열번호 6
<i>infBfucT2</i>	서열번호 7
<i>zwf</i>	서열번호 8
<i>gsk</i>	서열번호 9
<i>wcfB</i>	서열번호 10

<0044>

<0045> 유전자 *zwf* 및 *gsk*를 PCR을 통해 표 3의 올리고뉴클레오티드를 사용하여 *E. coli* K-12 (ATCC10798)의 게놈 DNA로부터 증폭하였다. 증폭된 유전자를 표 2의 제한효소 및 연결효소를 처리하여 pHfucT2 플라스미드에 클로닝하였으며, 각각 pHfucT2zwf 및 pHfucT2gsk를 제작하였다. pGlacZ△M15를 제작하기 위해, 2쌍의 프라이머 P1\_M15 lac/ P2\_M15 lac 와 P3\_M15 lac/P4\_M15 lac을 사용하여 *E. coli* K-12 게놈 DNA로부터 2개의 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편을 In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA, Japan)을 사용하여 pGRG36에 클로닝하였다. 모든 구조체는 제한효소 처리 및 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다.

<0046> 플라스미드 pKD46, pKD13 및 pCP20을 사용하는 λ-red mediated deletion 방



법을 통해 대장균 염색체상의 내인성 *lac* 오페론을 결실시켰다[Datsenko *et al.* (2000) Proceedings of the National Academy of Sciences 97(12):6640]. 또한, 트랜스포존을 이용하여 게놈염색체 상으로 *lacZΔM15*를 삽입하는 과정은 McKenzie *et al.* (2006) BMC microbiology 6(1):39을 참조하였다. 사용된 모든 균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오티드를 표 2 및 3에 기재하였다.

[표 2] 균주 및 플라스미드

균주	관련된 특징
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZΔM15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
<i>E. coli</i> BL21star(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (I <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)
ΔL	BL21star(DE3) Δ <i>lacZYA</i>
ΔL M15	BL21star(DE3) Δ <i>lacZYA</i> Tn7:: <i>lacZΔM15</i>
pETDuet-1	Two T7 promoters, pBR322 replicon, Amp <sup>R</sup>
pCOLADuet-1	Two T7 promoters, ColA replicon, Kan <sup>R</sup>
pGRG36	Tn7 insertion vector, pSC101 replicon, Amp <sup>R</sup>
pmBCGW	pETDuet-1 + <i>manC-manB</i> ( <i>NcoI</i> / <i>SacI</i> ) + <i>gmd-wcaG</i> ( <i>NdeI</i> / <i>KpnI</i> )
pHfucT2	pCOLADuet-1 + <i>fucT2</i> ( <i>NcoI</i> / <i>SacI</i> )
pGlacZΔM15	pGRG36+ <i>lacZΔM15</i>
pHfucT2zwf	pCOLADuet-1 + <i>fucT2</i> + <i>zwf</i> ( <i>NdeI</i> / <i>PacI</i> )
pHfucT2gsk	pCOLADuet-1 + <i>fucT2</i> + <i>gsk</i> ( <i>NdeI</i> / <i>PacI</i> )
pHD3fucT2	pCOLADuet-1 + D3 <i>fucT2</i> ( <i>NdeI</i> / <i>KpnI</i> )
pHinfBfucT2	pCOLADuet-1 + infB <i>fucT2</i> ( <i>NdeI</i> / <i>KpnI</i> )
pHwcfB	pCOLADuet-1 + <i>wcfB</i> ( <i>NdeI</i> / <i>KpnI</i> )

<0049>

[표 3] 사용된 프라이머

프라이머 이름	서열(5'→3')	서열번호
F_del_lac	CGAATGGCGCAAAACCTTTCGCGGTATGGCATGATAGCG CCCGGAAGAGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	서열번호 11
R_del_lac	TCCTGCGCTTTGTTCATGCCGGATGCGGCTAATGTAGATC GCTGAACCTTGATTCCCGGGATCCGTCGACC	서열번호 12
P1_M15 lac	AATTAATCAGATCCCGGGACCATCGAATGGCGCAAAA CCTTTC	서열번호 13
P2_M15 lac	GGTGCGGGCCACGACGGCCAGTGAATCCGTAATCA	서열번호 14
P3_M15 lac	TGGCCGTCGTGGCCCGCACCGATCGCC	서열번호 15
P4_M15 lac	GGCCGCTATTGACCCGGGGCTGTGGGTCAAAGAGGCA TGATG	서열번호 16
F_NdeI_gsk	GGAATTCCATATGAAATTTCCCGGTAAACGTAA	서열번호 17
R_PacI_gsk	CTTAATTAATTAACGATCCAGTAAGACTC	서열번호 18
F_NdeI_zwf	GGAATTCCATATGGCGGTAACGCAAACAGC	서열번호 19
R_PacI_zwf	CTTAATTAATTACTCAAACTCATTCCAGGAACG	서열번호 20
F_NdeI_D3fucT2	GGAATTCCATATGGATGATGATGCTTTTAA	서열번호 21
F_NdeI_infBfucT2	GGAATTCATATGACAGATGTAACGATTAAAGCTTTTA AGGTGGTGCAAATTTGC	서열번호 22
R_KpnI_fucT2	GGGTACCATTAAGCGTTATACTTTTGGGATTTTACCT	서열번호 23
F_NdeI_wcfB	GGAATTCATATGTTATATGTAATTTTACGTGGACGATT AAGG	서열번호 24
R_KpnI_wcfB	GGGTACCTCACATATTCTTCTTTCTTTTCCATATTAAT CGC	서열번호 25

<0050>

<0051> \* 이탤릭체로 표시된 서열은 *E. coli* 염색체에서 *lac* 오페론의 상동 재조합 부위를 의미함

<0052> \* 밑줄 표시 서열은 특정 제한효소의 인지 부위를 나타냄

<0053> \* 진하게 표시된 서열은 아미노산 태그를 의미함

<0054>

[실시예 2] 배양조건 및 방법



종균배양, 전배양 및 회분식 배양에는 적절한 항생제 (ampicillin 50  $\mu$ g/mL 및 kanamycin 50  $\mu$ g/mL)가 포함된 LB (Luria-Bertani) 배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride)를 이용하였으며, 종균배양에는 시험관을 이용하였고, 전배양 및 회분식 배양에는 100 mL의 LB배지가 담긴 500 mL들이의 플라스크 (baffled flask)에서 25℃, 교반 속도를 250 rpm으로 유지하며 배양하였다. 회분식 배양시에는 광학밀도(OD<sub>600</sub>)가 1.0에 도달하면, IPTG (isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside) 및 락토오스 최종 농도가 각각 0.1 mM 및 20 g/L이 되도록 첨가하였다. 고농도 세포배양을 위한 유가식 배양은 20 g/L 의 글리세롤 및 적절한 항생제를 포함하는 1.0 L의 최소배지 [13.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.7 g/L citric acid, 1.4 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10 ml/L 미량 원소 용액 (10 g/L Fe(III) citrate, 2.25 g/L ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.0 g/L CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.35 g/L MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.23 g/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O, 0.11 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 2.0 g/L CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O), pH 6.8]를 포함하는 2.5 L bioreactor (Kobiotech, Incheon, Korea)에서 실시하였다. 초기에 첨가한 글리세롤이 완전히 고갈된 후, 800 g/L의 글리세롤 및 20 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O를 포함하는 유입용액(feeding solution)을 pH-stat방법으로 공급하였다. 동시에, T7 프로모터-매개 유전자 발현을 유도하기 위해 IPTG 및 락토오스를 최종 농도가 0.1 mM 및 20 g/L가 되도록 추가하여 2-FL을 생산하였다. pH-stat 방법을 위해, pH가 글리세롤 고갈로 set-point보다 더 높아지면, 반응기 중에서 적정량의 유입용액이 자동으



로 공급되도록 하였다. 또한 배지의 pH가 set-point보다 더 낮아지면 28%  $\text{NH}_4\text{OH}$ 가 자동으로 첨가되어 pH가 일정범위 내(pH6.78~6.82)에서 유지되도록 하였다. 배지의 pH는 pH 전극 (Mettler Toledo, USA)을 사용하여 실시간으로 측정되었다. 건조균체량(dry cell weight, DCW)가 약 60에 도달한 후, 글리세롤 공급 속도를 수동으로 조절하였다. 교반 속도는 용해된 산소 결핍을 방지하기 위하여 초기1000 rpm에서 최대 1,200 rpm까지 증가시키고, 통기속도는 전 배양시간 동안 2 vvm으로 유지하였다.

### [실시예 3] 세포 및 세포외 대사산물 농도 결정

광학밀도 및 미리 측정한 변환 상수 0.36을 통해 건조균체량을 측정하였다. 광학밀도는 샘플을 희석하여 광학밀도를 0.1-0.5 사이로 유지한 후에 spectrophotometer (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 600 nm 흡광도에서 측정하였다. 2-FL, 락토오스, 글리세롤, 갈락토오스 및 아세트산의 농도는 Carbohydrate Analysis column (Rezex ROA-organic acid, Phenomenex, USA) 및 RI (refractive index) 검출기가 장착된 HPLC (high performance liquid chromatography) (Agilent 1100LC, USA)를 통해 측정하였다. 60℃에서 가열된 컬럼을 적용하여 20  $\mu\text{L}$  희석된 배양 배지를 분석하였다. 0.6 mL/min 유속으로 5 mM의  $\text{H}_2\text{SO}_4$  용액을 이동상으로 사용하였다.





<0058> [시험예 1] 재조합 대장균에서 *lac*오페론의 변형이 2-FL 생산에 미치는 영향  
평가

<0059> 세포 내로 공급되는 락토오스는 재조합 대장균에서 2-푸코실락토오스의 효율적 생합성을 위한 필수 요소 중 하나이다. 도 2에 도시한 바와 같이, *lacZ*유전자에 의해 코딩되는  $\beta$ -galactosidase는 락토오스가 세포생장에 이용될 수 있도록 포도당 및 갈락토오스로 분해시키는 효소이다. 야생형 대장균에서는 대부분 세포생장에 이용되던 락토오스의 대사흐름(metabolic flux)을 2-푸코실락토오스의 생합성 경로 쪽으로 전환시키기 위해 BL21star(DE3)에서 *lacZ*의 일부를 결실시키는 것을 시도하였으나, 이 균주에서는 2-푸코실락토오스의 생산이 관찰되지 않았다. 이는 락토오스를 세포 내로 운반하는 LacY가 LacZ와 하나의 오페론을 이루고 있기 때문에 프레임시프트(frame-shift)에 의해 LacY가 발현되지 못한 것으로 사료된다.

<0060> 한편, JM109균주는 락토오스를 세포 내로 흡수만 할 뿐 세포생장에 이용하지 못하므로, BL21star(DE3)의 내인성 *lac* 오페론을 JM109유래의 *lacZ* $\Delta$ M15 포함하는 *lac*오페론으로 교체를 시도하였다. 도 3은 BL21star(DE3) 균주에서 내인성 *lac* 오페론을 결실시키고, 새로운 *lac* 오페론을 도입하는 과정을 나타내는 모식도이다. 먼저, *lacI*의 20 bp 상류(upstream)로부터 *lacA* 40 bp 하류(downstream)까지의 내인성 *lac* 오페론 부위를  $\lambda$ -red recombination에 의해 결실시켜,  $\Delta$ L 균주(*lac*오페론 결핍 균주)을 제조하였다. 두 번째로, *lacZ* $\Delta$ M15를 포함하는 신규 오페론 단편을 Tn7 기관 트랜스포존에 의해 *gImS*유전자 부위에 삽입하였으며, 이를 통해  $\Delta$ L M15균주 (*lacZ* $\Delta$ M15 knock-in 균주)를 제작하였다.



*lac* 오페론의 변이가 2-푸코실락토오스의 생산에 미치는 영향을 pmBCGW와 pHfucT2 플라스미드를 포함하는 야생형 BL21star(DE3),  $\Delta L$  및  $\Delta L$  M15의 3가지 균주를 회분식으로 배양함으로써 평가하였다. 대조군 균주인 야생형 BL21star(DE3)는 75시간 이내에 초기 락토오스의 대부분을 소비하였고, 0.03 g 2-FL/g lactose의 수율로 0.58 g/L의 2-FL을 생산하였다 (도 4a). 다른 균주들과 비교하여 최종 건조균체량이 가장 많았기 때문에 소비된 락토오스는 대부분 세포 성장을 위해 사용되었을 것으로 사료된다. 반면,  $\Delta L$ 균주는 극소량의 락토오스(0.06 g/L) 만을 소비하고 0.04 g/L의 2-푸코실락토오스 (도 4b)를 생산하였는데, 이는 소량의 락토오스가 단순 확산을 통해 세포로 이동하였기 때문일 것으로 사료된다. 비록 가장 적은 양의 2-FL 농도가 수득되었으나,  $\Delta L$ 은 락토오스로부터 가장 높은 값의 2-FL 수율(0.951 M 2-FL/ M lactose에 상응하는 0.667 g 2-FL/g lactose)을 보여주었다. 이는 세포 내로 이동된 대부분의 락토오스가 2-푸코실락토오스로 전환되었기 때문인데, 이는  $\Delta L$ 이 락토오스를 대사시킬 수 없음에 기인한다.  $\Delta L$  M15균주는 1.65 g/L 락토오스를 소비하였고, 0.15 g/L의 2-FL을 축적하였다. 그러나,  $\Delta L$  M15 균주에서 0.09 g 2-FL/g lactose의 수율은 대조군 균주와 비교하여 3.3배 증가하였다 (도 4c). 결과적으로, BL21star(DE3)균주의 락토오스 동화 속도를 크게 낮추었으며, 이는 내인성 *lac* 오페론을 변형된 오페론으로 교체하는 것이 2-푸코실락토오스 생산에 효과적임을 나타낸다. 회분식 배양 결과는 표 4에 요약하였다.





<0062> [ 표 4 ]

균주명	최대 건조균체량 (g/L)	최대 2-푸코실 락토오스 농도 (g/L)	락토오스 소모량 (g/L)	수율 (g 2-푸코실락토오스 /g 락토오스)
<b>BL21star(DE3)</b>				
pmBCGW pHfucT2	4.0	0.58	20.5	0.028
<b>ΔL</b>				
pmBCGW pHfucT2	1.4	0.04	0.06	0.667
<b>ΔL M15</b>				
pmBCGW pHfucT2	1.1	0.15	1.65	0.091

<0063>

<0064> [시험예 2] G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 또는 GSK (guanosine-inosine kinase)의 공동발현이 2-푸코실락토오스의 생산에 미치는 영향 평가

<0065> NADPH와 같은 보조인자(cofactor) 생성 관련 효소의 추가 과발현이 2-푸코실락토오스의 생산에도 영향을 주는지를 평가하기 위해, ΔL M15에 2-FL 생합성 효소 (ManB, ManC, Gmd, WcaG 및 FucT2)를 과발현시킨 균주와 이 균주에 각각 G6PDH (glucose 6-phosphate dehydrogenase) 또는 GSK (guanosine-inosine kinase)를 추가발현 시킨 균주들을 2.5 L 생물반응기에서 유가식으로 배양하였다. 유가배양 동안 아세트산의 축적은 관찰되지 않았다. 도 5a에서 나타낸 바와 같이, 대조군 균주인 ΔL M15에 2-FL 생합성 효소만 과발현시킨 균주에서는 최종 건조균체량이 73.1 g/L를 나타내었고, 최종농도 3.4 g/L의 2-푸코실락토오스를 0.08 g 2-푸코실락토오스/g 락토오스의 수율로 수득하였다. 또한, 도 5b와 5c에서 볼 수 있듯이, 2-FL



생합성 효소와 함께 G6PDH 또는 GSK를 과발현하는 재조합 대장균  $\Delta L$  M15 균주는 전 배양 공정 동안 대조군과 비교하여 유사한 성장 패턴을 보여주었다. 또한, 아세테이트 축적은 유가배양 들 다에서 관찰되지 않았다. G6PDH를 과발현하는 재조합 대장균의 유가 배양에서 0.13 g 2-FL/g lactose의 수율로 4.61 g/L의 2-푸코실락토오스를 수득하였으며, 이는 대조군 균주와 비교하여 2-푸코실락토오스의 농도 및 수율에서 각각 36% 및 45% 향상된 것이다. GSK가 과발현된 재조합 대장균 배양에서 0.12 g 2-FL/g lactose 의 수율로 4.91 g/L 의 2-푸코실락토오스를 수득하였으며, 이는 대조군 균주와 비교하여 2-푸코실락토오스의 농도 및 수율 각각에서 45% 및 46% 향상된 것이다. 이러한 결과에 비추어 볼 때, G6PDH 또는 GSK의 추가 발현은 세포내 GDP-L-fucose생산 뿐 아니라, 2-푸코실락토오스의 생산에도 중요한 요소로 작용할 수 있음을 의미한다. 유가 배양의 결과는 표 5에 나타내었다.

<0066>

<0067>

### [시험예 3] $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소의 N-말단에 삽입한 아미노산 단편이 2-푸코실락토오스의 생산에 미치는 영향

<0068>

2-푸코실락토오스의 생산에 관한 선행연구들에서 발현에 문제가 있었던 *H. pylori*유래의  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소에 아미노산 태그를 부착시키는 방법을 적용해서, 이것이 2-푸코실락토오스의 생산에 어떤 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다. 먼저, FucT2의 개시코돈(ATG)과 뒤따르는 서열 사이에 아스파테이트(aspartate) 및 아르기닌(arginine) 등의 아미노산 서열을 다양한 길이로 부착시킨 융합  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소 라이브러리를 구축하였다. 또한, infB의 1~21번째



서열을 말단에 부착시킨 변이  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소를 도입한 균주도 구축을 하였다. 구축한 재조합 대장균들을 플라스크 수준의 회분식 배양으로 확인한 결과, N-말단에 아스파테이트 3개(GATGATGAT)를 결합시킨 것과 infB의 1~21번째 서열(ATGACAGATGTAACGATTAAG)을 결합시킨 변이  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소를 도입한 균주에서 2-푸코실락토오스가 생성됨을 확인할 수 있었다. 도 5d와 5e는 각각  $\Delta$ L M15/pmBCGW+pHD3fucT2와  $\Delta$ L M15/pmBCGW+pHinfBfucT2를 유가식 공정으로 배양한 결과를 나타내고 있다. 발효 약 22시간에 IPTG, 락토오스를 첨가하면서 글리세롤 공급을 시작한 이후로 단백질 발현이 유도되면서 세포생장 및 2-푸코실락토오스의 생산은 지속적으로 증가하였다. 건조 균체량은 각각 70.1 g/L와 73.0 g/L까지 증가하였고, 2-푸코실락토오스는 각각 8.7 g/L와 8.0 g/L까지 증가하였다(태그를 부착하지 않은 경우보다 약 2.6배와 2.4배 증가). 이는 아스파테이트와 infB 태그의 부착으로 인하여  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소의 발현이 수월해지면서 활성도가 증대되었기 때문인 것으로 사료된다.

#### <0069> [시험예 4] 신규 $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소의 도입이 2-푸코실락토오스의 생산에 미치는 영향

<0070> 선행연구들에서 이용되었던 *H. pylori* 유래의  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소(FucT2)는 대부분이 inclusion body를 형성하기 때문에 매우 낮은 수준의 활성도를 나타내는 문제점이 있었다. 따라서, *H. pylori* 유래의 fucT2보다 활성형으로 발현이 잘되는 유전자를 찾기 위해 서로 다른 유래의  $\alpha$ -1,2-푸코스전이효소로 추정되는



11종의 유전자들을 각각 ΔL M15균주에 pmBCGW플라스미드와 함께 도입하여 유전자 라이브러리를 구축한 후, 회분식 배양을 통해 2-푸코실락토오스의 생산성능을 테스트하였다. 그 중에서 유일하게 *Bacteroides fragilis* 유래의 *wcfB*를 도입한 재조합 대장균에서만 2-푸코실락토오스가 생성됨을 확인할 수 있었다. 한편, 유가식 배양에서는 최종 건조균체량이 62.0 g/L까지 성장하였고, 2-푸코실락토오스를 최종농도 18.0 g/L로 수득할 수 있었다. 이는 *H. pylori* 유래의 *fucT2*를 이용했을 때보다 5.3 배 향상된 수치인데, 이는 *wcfB*가 *fucT2*보다 푸코실화 활성도(fucosylation activity)가 더 높기 때문에 세포 내로 유입된 락토오스의 푸코실화가 더 빠르게 진행되었기 때문으로 사료된다.

<0071>

[표 5]

ΔL M15 균주에 도입된 플라스미드	최대 건조균체량 (g/L)	최대 2-푸코실락토오스 농도 (g/L)	수율 (g 2-푸코실락토오스 /g 락토오스)
pmBCGW pHfucT2	73.1	3.4	0.083
pmBCGW pHfucT2zwf	76.7	4.6	0.128
pmBCGW pHfucT2gsk	72.0	4.9	0.121
pmBCGW pHD3fucT2	70.1	8.7	0.310
pmBCGW pHinfBfucT2	73.0	8.0	0.250
pmBCGW pHwcfB	62.0	18.0	0.512

<0072>



<0073>

이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태 일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.



## 【특허청구범위】

### 【청구항 1】

2-푸코실락토오스 (2-Fucosyllactose, 2-FL)를 생산하는 대사회로를 가지는 미생물에서,

(a) 내인성 *lac* 오페론이 제거되고, *lacZΔM15* 오페론이 도입; 및

(b) α-1,2-fucosyltransferase 또는 이의 변이체, (c) G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 (d) GSK (guanosine-inosine kinase)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 코딩하는 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

### 【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 2-푸코실락토오스를 생산하는 대사회로를 가지는 미생물은 *E. coli* BL21star (DE3)인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

### 【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 *lacZΔM15* 오페론은 *E. coli* K-12 균주 유래인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.



【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 G6PDH를 코딩하는 유전자는 *Escherichia coli* (strain K12), *Escherichia coli* 0157:H7, *Escherichia coli* 06:H1, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nostoc* sp., *Mycobacterium smegmatis*, *Rhizobium meliloti*, *Streptococcus pneumoniae* serotype 4, *Zymomonas mobilis* subsp. *Mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Chlamydia pneumonia*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Arabidopsis thaliana*, *Synechococcus elongates*, *Dickeya dadantii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Borrelia burgdorferi*, *Buchnera aphidicola* subsp. *Acyrtosiphon pisum*, *Buchnera aphidicola* subsp. *Schizaphis graminum*, *Buchnera aphidicola* subsp. *Baizongia pistaciae*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus influenza*, *Nostoc punctiforme*, *Synechocystis* sp., *Thermotoga maritime*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Bacillus thuringiensis*, *Solanum tuberosum*, *Takifugu rubripes*, 또는 *Macropus robustus* 유래인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 5】



제1항에 있어서,

상기 G6PDH를 코딩하는 유전자는 *zwf*인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 6】

제1항에 있어서,

상기 GSK를 코딩하는 유전자는 *Escherichia coli* (strain K-12),  
*Escherichia coli* 0157:H7, *Escherichia coli* 06:H1, *Exiguobacterium acetylicum*  
유래인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

상기 GSK를 코딩하는 유전자는 *gsk*인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 8】

제1항에 있어서,

상기  $\alpha$ -1,2 fucosyltransferase를 코딩하는 유전자는 *Helicobacter pylori*,  
*Bacteroides fragilis*, *Dyadobacter fermentans*, *Enterococcus faecium* D0,  
*Escherichia coli* 0128:B12, *Helicobacter hepaticus*, *Lactococcus lactis* subsp.  
*Cremoris*, *Silicibacter pomeroyi*, *Pedobacter heparinus* 또는 *Pedobacter saltans*  
유래인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.





【청구항 9】

제1항에 있어서,

상기  $\alpha$ -1,2 fucosyltransferase를 코딩하는 유전자는 *FucT2* 또는 *WcfB*인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 10】

제9항에 있어서,

상기 *FucT2*는 *Helicobacter pylori* 유래인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 11】

제9항에 있어서,

상기 *WcfB*는 *Bacteroides fragilis* 유래인 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 12】

제1항에 있어서,

상기 변이체는  $\alpha$ -1,2 fucosyltransferase의 N-말단에 아스파테이트(aspartate) 반복서열 또는 infB (translation initiation factor)의 1~7번째 아미노산을 코딩하는 유전자를 태그로 결합시킨 것을 특징으로 하는 변이 미생물.



【청구항 13】

제1항에 있어서,

상기 2-푸코실락토오스는 de novo 합성 경로를 거쳐 합성되는 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 14】

제13항에 있어서,

ManA (mannose-6-phosphate isomerase), ManB (phosphomannomutase), ManC (mannose-1-phosphate guanylttransferase), Gmd (GDP-D-mannose dehydratase) 및 WcaG (Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 효소를 코딩하는 유전자가 추가로 도입 또는 증폭되어 있는 것을 특징으로 하는 변이 미생물.

【청구항 15】

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 변이 미생물을 배양하여 2-푸코실락토오스를 생성시킨 다음, 배양액으로부터 2-푸코실락토오스를 회수하는 것을 특징으로 하는 2-푸코실락토오스의 제조방법.

【청구항 16】

제15항에 있어서,



상기 배양은 글리세롤을 추가하는 유가배양인 것을 특징으로 하는 2-푸코실  
락토오스의 제조방법.



## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 2-푸코실락토오스를 생산하기 위한 변이 미생물 및 이를 이용한 2-푸코실락토오스의 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 *lacZ* 변형 오페론 도입; 및 FucT2 또는 *이*의 변이체를 코딩하는 유전자, G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 GSK (guanosine-inosine kinase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 변이 미생물 및 이를 이용하여 2-푸코실락토오스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

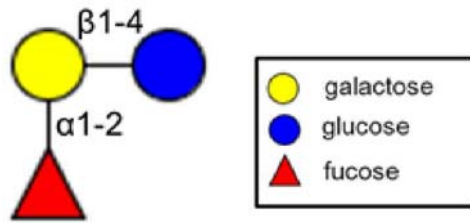
### 【대표도】

도 2

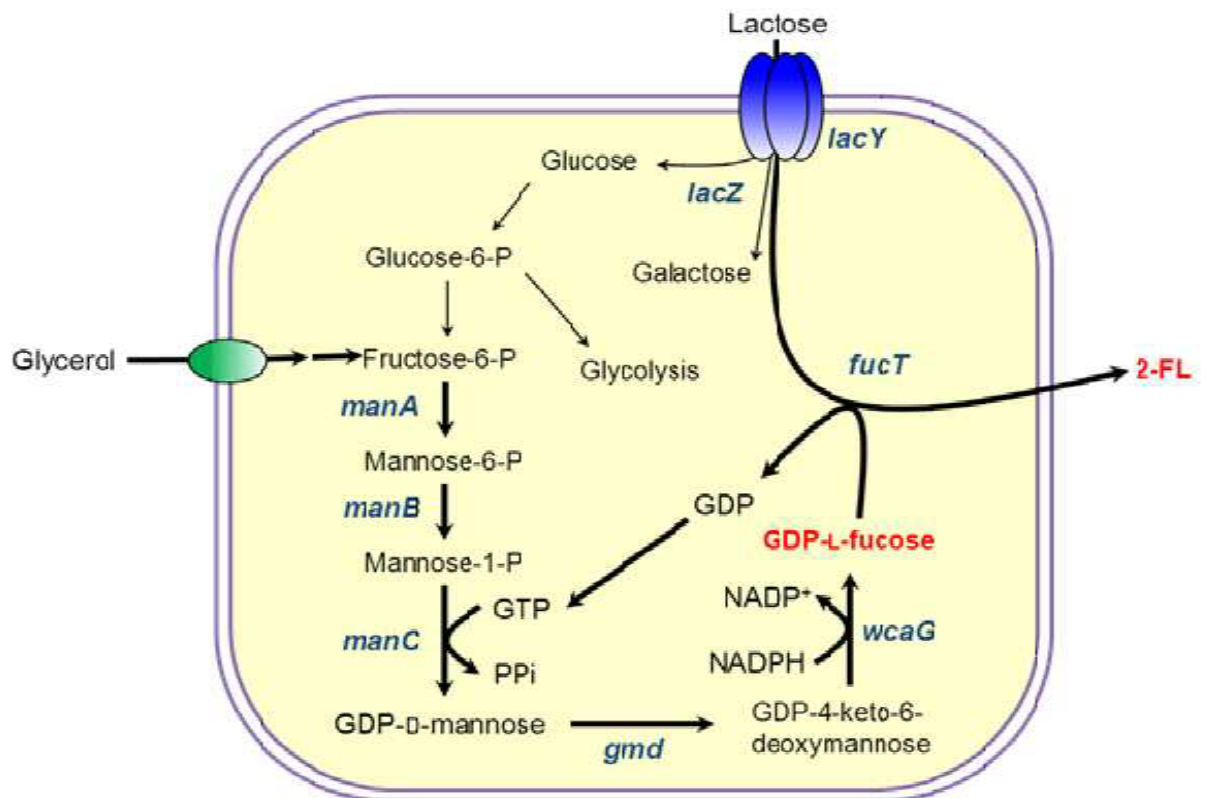


【도면】

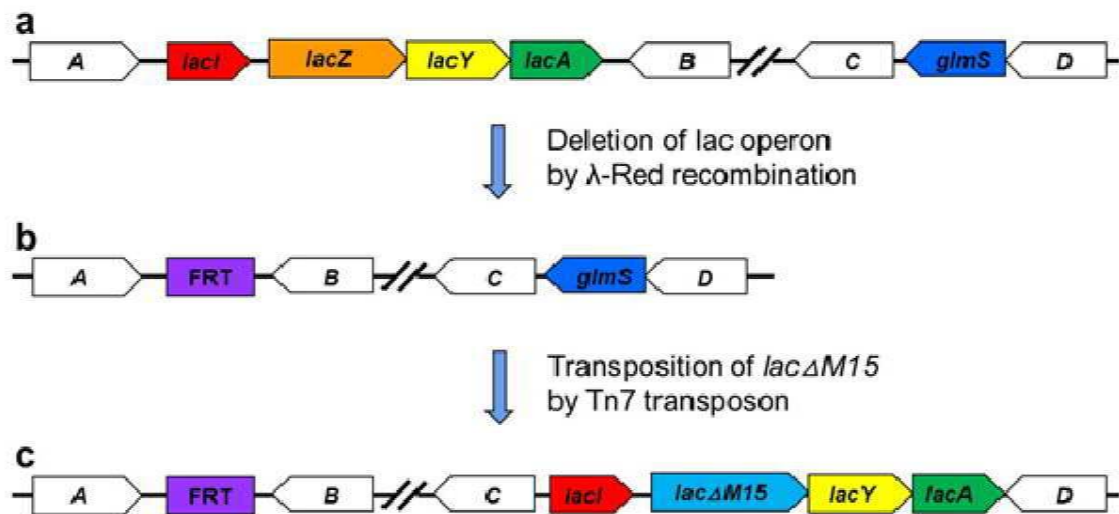
【도 1】



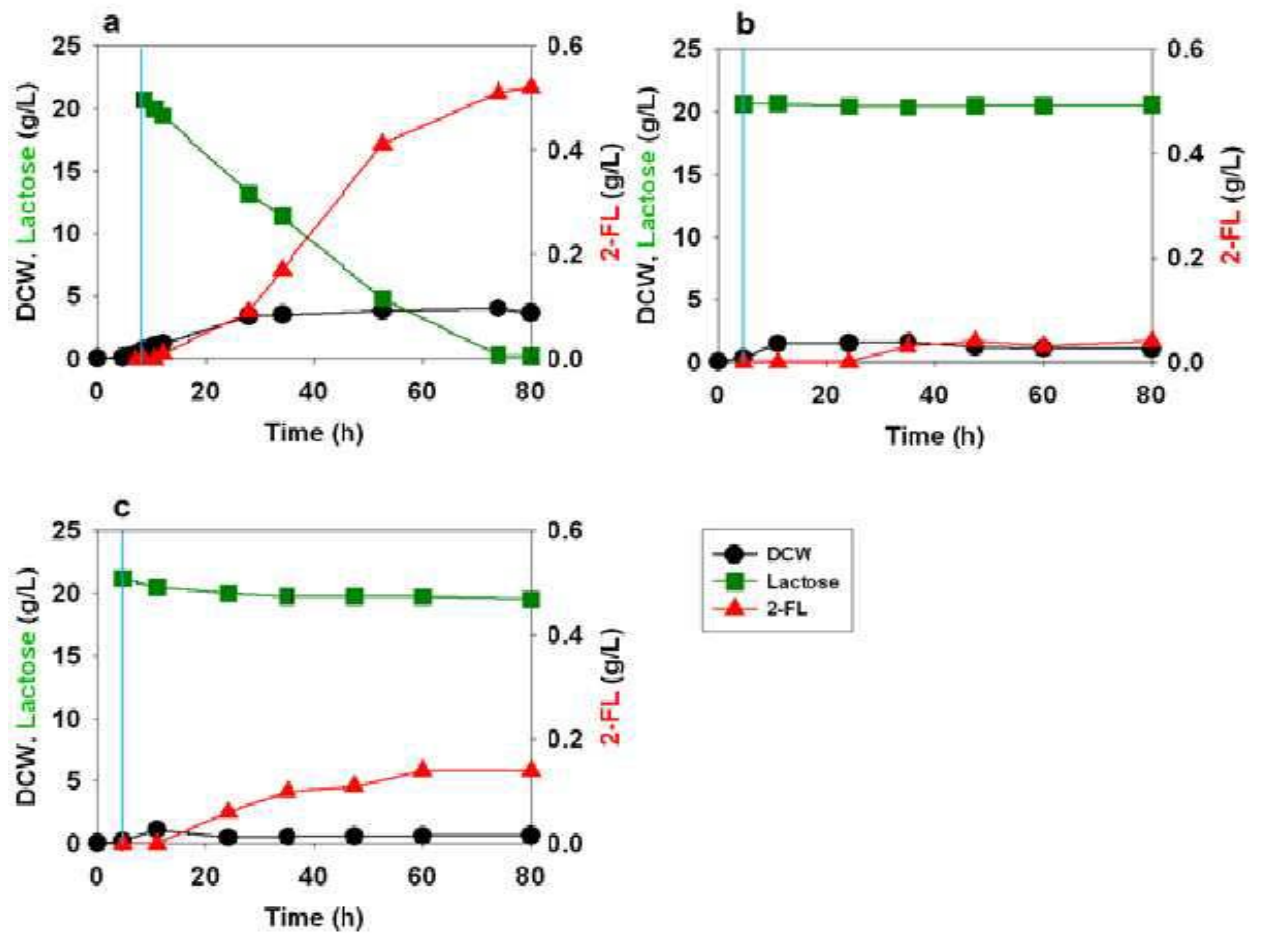
【도 2】

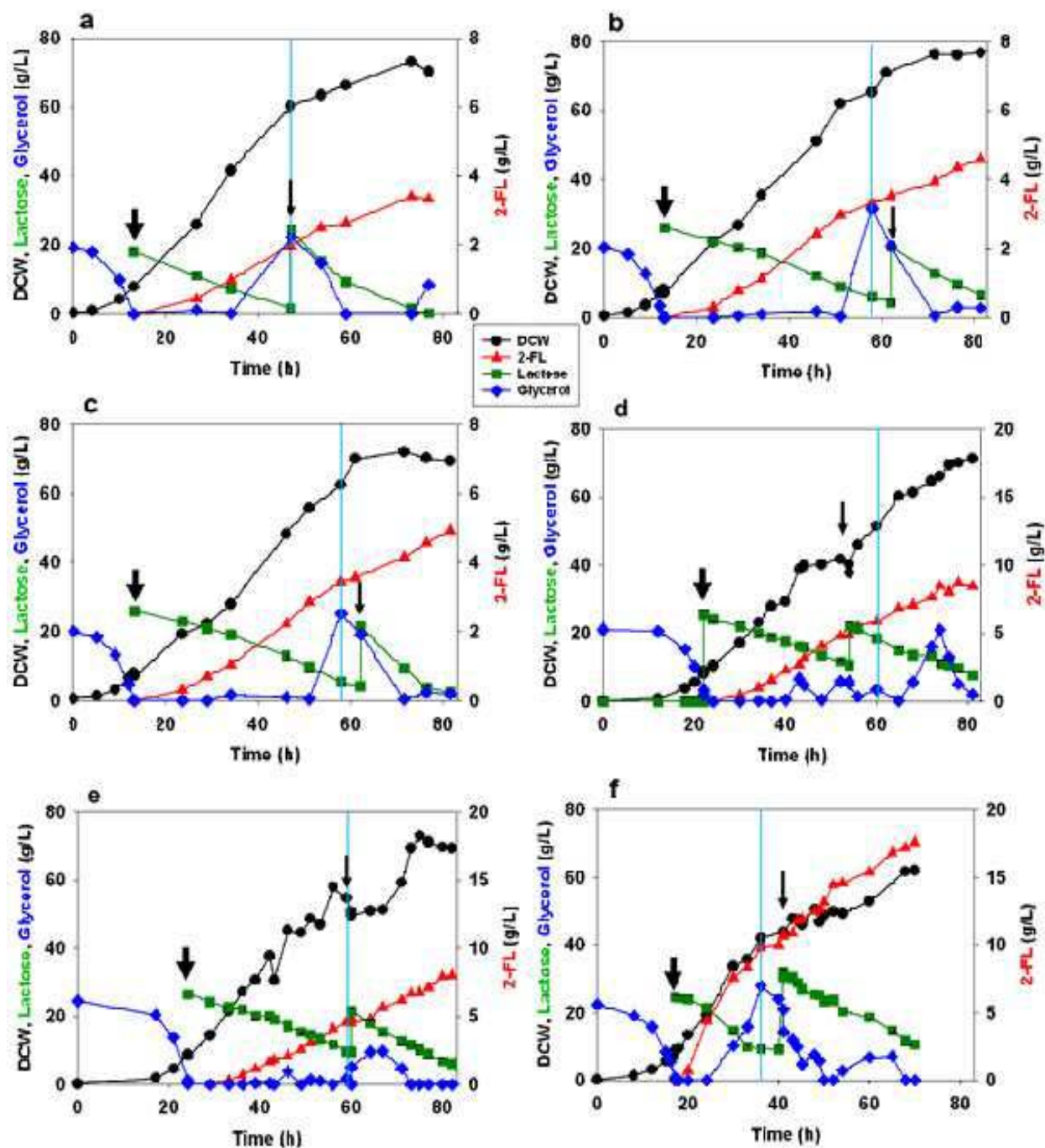


【도 3】

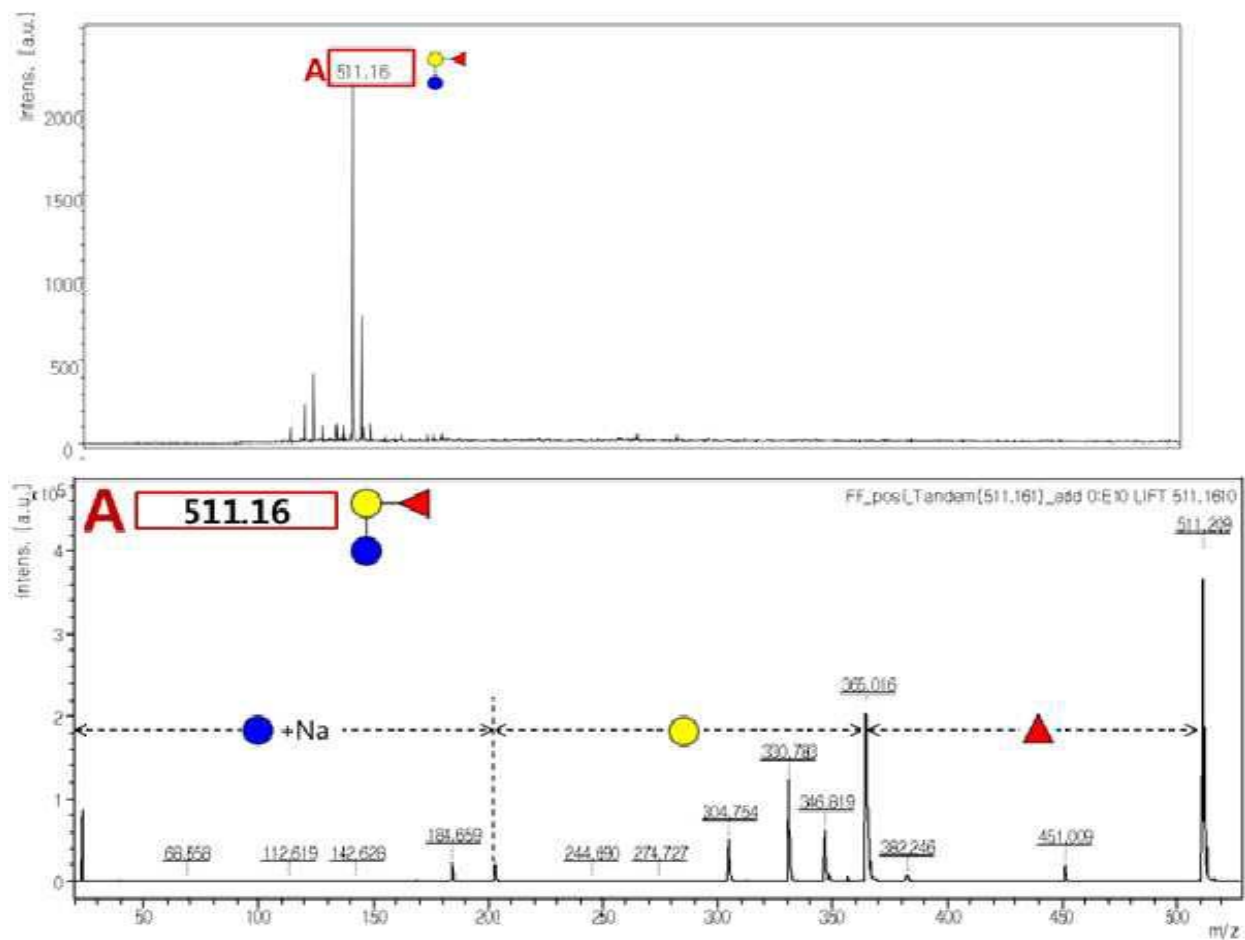


【도 4】





【도 6】





## 【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

(C:\WKIPONET\WKEditor\appfile\WP14-B265\_F.app)



<110> Seoul National University R&Db Foundation  
 <120> Variant Microorganism for Producing 2-Fucosyllactose and Method  
 of Producing 2-Fucosyllactose by Using the Same  
 <130> P14-B265  
 <160> 25  
 <170> KopatentIn 2.0  
 <210> 1  
 <211> 1122  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> gmd from E. coli K-12 ATCC10798  
  
 <400> 1  
 atgtcaaaag tcgctctcat caccggtgta accggacaag acggttctta cctggcagag 60  
 ttctgtctgg aaaaagggtta cgagggtgcat ggtattaagc gtcgcgcatac gtcattcaac 120  
 accgagcgcg tggatcacat ttatcaggat ccgcacacct gcaacccgaa attccatctg 180  
 cattatggcg acctgagtga tacctctaac ctgacgcgca ttttgcgtga agtacagccg 240  
 gatgaagtgt acaacctggg cgcaatgagc cacgttgcgg tctcttttga gtcaccagaa 300  
 tataccgctg acgtcgacgc gatgggtacg ctgcgcctgc tggaggcgat ccgcttcctc 360  
 ggtctggaaa agaaaactcg ttctatcag gcttcacact ctgaactgta tggctcgtg 420  
 caggaaattc cgcagaaaga gaccacgccg ttctacccgc gatctccgta tgcggtcgcc 480  
 aaactgtacg cctactggat caccgttaac taccgtgaat cctacggcat gtacgcctgt 540  
 aacggaattc tcttcaacca tgaatccccg cgccggggcg aaaccttcgt taccgcgaaa 600  
 atcacccgcg caatcgccaa catcgcccag gggctggagt cgtgcctgta cctcggcaat 660  
 atggattccc tgcgtgactg gggccacgcc aaagactacg taaaaatgca gtggatgatg 720  
 ctgcagcagg aacagccgga agatttcgtt atcgcgaccg gcgttcagta ctccgtgcgt 780  
 cagttcgtgg aaatggcggc agcacagctg ggcatcaaac tgcgctttga aggcacgggc 840  
 gttgaagaga agggcattgt ggtttccgtc accgggcatg acgcgccggg cgttaaaccg 900  
 ggtgatgtga ttatcgctgt tgaccgcgt tacttccgtc cggctgaagt tgaaacgctg 960  
 ctcggcgacc cgaccaaagc gcacgaaaaa ctgggctgga aaccggaaat caccctcaga 1020  
 gagatgggtgt ctgaaatggt ggctaattgac ctggaagcgg cgaaaaaaca ctctctgctg 1080  
 aaatctcacg gctacgacgt ggcgatcgcg ctggagtcac aa 1122  
  
 <210> 2  
 <211> 968  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> wcaG from E. coli K-12 ATCC10798

<400> 2  
gcatgagtaa acaacgagtt tttattgctg gtcatcgcg gatggtcggt tccgcatca 60  
ggcggcagct cgaacagcgc ggtgatgtgg aactggtatt acgcacccgc gacgagctga 120  
acctgctgga cagccgcgcc gtgcatgatt tctttgccag cgaacgtatt gaccaggtct 180  
atctggcggc ggcgaaagtg ggcggcattg ttgccaacaa cacctatccg gcggatttca 240  
tctaccagaa catgatgatt gagagcaaca tcattcacgc cgcgcatcag aacgacgtga 300  
acaaactgct gtttctcga tgcctctgca tctacccgaa actggcaaaa cagccgatgg 360  
cagaaagcga gttgttcag ggcacgctgg agccgactaa cgagccttat gctattgcc 420  
aaatcgccgg gatcaaactg tgcgaatcat acaaccgcca gtacggacgc gattaccgct 480  
cagtcatgcc gaccaacctg tacggggcac acgacaactt ccacccgagt aattcgcatg 540  
tgatcccagc attgctgctg cgcttcacg aggcgacggc acagaatgcg ccggacgtgg 600  
tggtatggg cagcgggtaca ccgatgcgcg aatttctgca cgtcgtgat atggcggcgg 660  
cgagcattca tgcattggag ctggcgcatg aagtctggct ggagaacacc cagccgatgt 720  
tgtcgacat taacgtcggc acgggcgttg actgcactat ccgcgagctg gcgcaaacca 780  
tcgcaaagt ggtgggttac aaaggccggg tggtttttga tgccagcaaa ccggatggca 840  
cgccgcgcaa actgctggat gtgacgcgcc tgcacagct tggctggat cagcaaatct 900  
cactggaagc ggggcttgcc agcacttacc agtggttcct tgagaatcaa gaccgctttc 960  
gggggtaa 968

<210> 3  
<211> 1437  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> manC from E. coli K-12 ATCC10798

<400> 3  
atggcgcagt cgaaactcta tccagtttg atggcaggtg gctccggtag ccgcttatgg 60  
ccgctttccc gcgtacttta tccaagcag ttttatgcc tgaaggcga tctcaccatg 120  
ctgcaaacca ccattctgcc cctgaacggc gtggagtgcg aaagcccggt ggtgatttgc 180  
aatgagcagc accgctttat tgcgcggaa cagctgcgtc aactgaacaa acttaccgag 240  
aacattattc tcgaaccggc agggcgaaac acggcacctg ccattgcgtt ggccgcgctg 300  
gcggcaaaac gcatagccc ggagagcgac ccgttaatgc tggatttggc ggccgatcat 360  
gtgattgccg atgaagacgc gttccgtgcc gccgtgcgta atgcatgcc atatgccgaa 420  
gcgggcaagc tggtagcctt cggcatttg ccgatctac cagaaaccgg ttatggctat 480  
attcgtcgcg gtgaagtgtc tgcgggtgag caggatatgg tggcctttga agtggcgcag 540  
tttgtcga aaaccgaatct ggaaccgct caggcctatg tggcaagcgg cgaatattac 600  
tggaacagcg gtatgttcct gttccgcgcc ggacgctatc tcgaagaact gaaaaaatat 660

cgcccggata tcctcgatgc ctgtgaaaaa gcgatgagcg ccgtcgatcc ggatctcaat	720
tttattcgcg tggatgaaga agcgtttttc gcctgcccg aagagtcggt ggattacgcg	780
gtcatggaac gtacggcaga tctgtttgtg gtgccgatgg atgcgggctg gagcgatgtt	840
ggctcctggt cttcattatg ggagatcagc gccacaccg ccgagggcaa cgtttgccac	900
ggcgatgtga ttaatcacia aactgaaaac agctatgtgt atgctgaatc tggcctggtc	960
accaccgtcg ggggtgaaaga tctggtagtgt gtgcagacca aagatgcggt gctgattgcc	1020
gaccgtaacg cggtagacga tgtgaaaaa gtggtcgagc agatcaaagc cgatggtcgc	1080
catgagcatc ggggtgatcg cgaagtgtat cgtccgtggg gcaaatatga ctctatcgac	1140
gcgggcgacc gctaccaggt gaaacgcac accgtgaaac cgggcgaggg ctgtcggtta	1200
cagatgcacc atcaccgcgc ggaacactgg gtggttgtcg cgggaacggc aaaagtcacc	1260
attgatggtg atatacaact gcttgggtgaa aacgagtgca ttatatattc gctgggggcg	1320
acgcattgcc tggaaaaccc ggggaaaatt ccgctcgatt taattgaagt gcgctccggc	1380
tcttatctcg aagaggatga tgtggtgcgt ttcgcggatc gctacggacg ggtgtaa	1437

<210> 4  
 <211> 1475  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> manB from E. coli K-12 ATCC10798

<400> 4	
acgtcgcatc aggcaatgaa tgcgaaaccg cgggtgtaa aacgacaaaa ataaaattgg	60
ccgcttcggt cagggccaac tattgcctga aaaagggtta cgatatgaaa aaattaacct	120
gctttaaagc ctatgatatt cgcgggaaat taggcgaaga actgaatgaa gatatcgctt	180
ggcgcatgg tgcgcctat ggcgaatttc tcaaaccgaa aaccattgtg ttaggcggtg	240
atgtccgct caccagcgaa accttaaaac tggcgtggc gaaagggtta caggatcgcg	300
gcgttgacgt gctggatatt ggtatgtccg gcaccgaaga gatctatttc gccacgttcc	360
atctcggcgt ggatggcggc attgaagtta ccgccagcca taatccgatg gattataacg	420
gcatgaagct ggttcgcgag ggggctcgcc cgatcagcgg agataccgga ctgcgcgacg	480
tccagcgtct ggctgaagcc aacgactttc ctcccgtcga tgaaacaaaa cgcggtcgct	540
atcagcaaat caacctgctg gacgcttacg ttgatcacct gttcggttat atcaatgtca	600
aaaacctcac gccgctcaag ctggtgatca actccgggaa cggcgagcgg ggtccggtgg	660
tggacgcat tgaagccgc tttaaagccc tcggcgcgcc cgtggaatta atcaaagtgc	720
acaacacgcc ggacggcaat ttccccaacg gtattcctaa cccactactg ccggaatgcc	780
gcgacgacac ccgcaatgcg gtcatcaaac acggcgcgga tatgggcatt gcttttgatg	840
gcgattttga ccgctgtttc ctgtttgacg aaaaagggca gtttattgag ggctactaca	900

P14-B265\_F.app

ttgtcggcct gttggcagaa gcatcctcg aaaaaatcc cggcgcgaag atcatccacg	960
atccacgtct ctcttggaac accgttgatg tggtagctgc cgcagggtggc acgccggtaa	1020
tgtcgaaaac cggacacgcc ttatttaaag aacgtatgcg caaggaagac gccatctatg	1080
gtggcgaaat gagcgccac cattacttcc gtgatttcgc ttactgcgac agcggcatga	1140
tcccgtaggt gctggtcgcc gaactggtgt gcctgaaaga taaaacgctg ggcgaactgg	1200
tacgcgaccg gatggcggcg ttccggcaa gcggtgagat caacagcaaa ctggcgcaac	1260
ccgttgaggc gattaaccgc gtggaacagc attttagccg tgaggcgctg gcggtggatc	1320
gcaccgatgg catcagcatg acctttgccg actggcgctt taacctgcgc acctccaata	1380
ccgaaccggt ggtgcgcctg aatgtggaat cgcgcggtga tgtgccgctg atggaagcgc	1440
gaacgcgaac tctgctgacg ttgctgaacg agtaa	1475

<210> 5  
 <211> 903  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> fucT2 from H. pylori26695 ATCC700392

<400> 5	
atggctttta aggtggtgca aatttgcgga gggcttggga atcaaatgtt tcaatacgt	60
ttcgctaaaa gtttgcaaaa acactctaata acgcctgtgc tgttagatat cacttctttt	120
gattggagcg ataggaaaat gcaattagaa cttttcccta ttgatttgcc ctatgcgagc	180
gcgaaagaaa tcgctatagc taaaatgcaa cacctcccca agctagtaag agacgcgctc	240
aaatgcatgg gatitgatag ggtgagtcga gaaatcgitt ttgaatacga gcctaaattg	300
ctaaagccaa gcgccttgac ttattttttt ggctatttcc aagatccacg atactttgat	360
gctatatccc cttaatacaa gcaaaccctc actctacccc cccccccga aaataataag	420
aaataataata aaaaagagga agaataatcag tgcaagcttt ctttgatttt agccgctaaa	480
aacagcggtg ttgtgcatat aagaagaggg gattatgtgg ggattggctg tcagcttggg	540
attgactatc aaaaaaggc gcttgagtat atggcaaagc gcgtgccaaa catggagctt	600
tttgtgtttt gcgaagactt agaattcacg caaaatcttg atcttggcta cctttttatg	660
gacatgacca ctagggataa agaagaagag gcgtattggg acatgctgct catgcaatct	720
tgtcagcatg gcattatcgc taatagcact tatagctggg gggcggccta ttgatagaa	780
aatccagaaa aatcattat tggcccaaaa cactggcttt ttgggcatga gaatatcctt	840
tgtaaggagt gggtgaaaat agaatcccat tttagggtaa aatcccaaaa gtataacgct	900
taa	903

<210> 6  
 <211> 912  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> D3fucT2

<400> 6  
 atggatgatg atgcttttaa ggtggtgcaa atttgcggag ggcttgggaa tcaaatgttt 60  
 caatacgttt tcgctaaaag ttgcaaaaa cactctaata cgcctgtgct gttagatata 120  
 actttctttg attgagcgga taggaaaatg caattagaac ttttccctat tgatttgccc 180  
 tatgcgagcg cgaaagaaat cgctatagct aaaatgcaac acctcccaa gctagtaaga 240  
 gacgcgtca aatgcatggg atttgatagg gtgagtcaag aaatcgtttt tgaatacgag 300  
 cctaaattgc taaagccaag ccgcttgact tatttttttg gctatttcca agatccacga 360  
 tactttgatg ctatatcccc tttaatcaag caaaccttca ctctaccccc ccccccgaa 420  
 aataataaga ataataataa aaaagaggaa gaatatcagt gcaagctttc ttgatttta 480  
 gccgctaaaa acagcgtgtt tgtgcatata agaagagggg attatgtggg gattggctgt 540  
 cagcttggta ttgactatca aaaaaaggcg cttgagtata tggcaaagcg cgtgccaaac 600  
 atggagcttt ttgtgttttg cgaagactta gaattcacgc aaaatcttga tcttggctac 660  
 ccttttatgg acatgaccac tagggataaa gaagaagagg cgtattggga catgctgctc 720  
 atgcaatctt gtcagcatgc cattatcgtt aatagcactt atagctgggt gccggcctat 780  
 ttgatagaaa atccagaaaa aatcattatt ggccccaac actggctttt tgggcatgag 840  
 aatatccttt gtaaggagtg ggtgaaaata gaatccatt ttgaggtaaa atccaaaag 900  
 tataacgctt aa 912

<210> 7  
 <211> 921  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> infBfucT2

<400> 7  
 atgacagatg taacgattaa agcttttaag gtggtgcaaa ttgcgagg gcttgggaat 60  
 caaatgtttc aatacgtttt cgctaaaagt ttgcaaaaac actctaatac gcctgtgctg 120  
 ttagatatca cttcttttga ttggagcgat aggaaaatgc aattagaact tttccctatt 180  
 gatttgcct atgcgagcgc gaaagaaatc gctatagcta aaatgcaaca cctcccaag 240  
 ctagtaagag acgcgctcaa atgcatggga ttgataggg tgagtcaaga aatcgttttt 300  
 gaatacgagc cttaaattgt aaagccaagc cgcttgactt attttttgg ctatttccaa 360  
 gatccacgat actttgatgc tatatccct ttaatcaagc aaaccttcac tctaccccc 420  
 cccccgaaa ataataagaa taataataaa aaagaggaag aatatcagt caagctttct 480  
 ttgattttag ccgctaaaaa cagcgtgttt gtgcatataa gaagagggga ttatgtggg 540  
 attggctgtc agcttgggtat tgactatcaa aaaaaggcgc ttgagtatat ggcaaagcgc 600

gtgccaaaca tggagctttt tgtgttttgc gaagacttag aattcacgca aaatcttgat	660
cttggctacc cttttatgga catgaccact agggataaag aagaagaggc gtattgggac	720
atgctgctca tgcaatcttg tcagcatgcc attatcgcta atagactta tagctggtgg	780
gcggcctatt tgatagaaaa tccagaaaaa atcattattg gcccacaaaca ctggcttttt	840
gggcatgaga atatcctttg taaggagtgg gtgaaaatag aatcccatth tgaggtaaaa	900
tcccaaaagt ataacgctta a	921

<210> 8  
 <211> 1476  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> zwf from E. coli K-12 ATCC10798

<400> 8	
atggcggtaa cgcaaacagc ccaggcctgt gacctggtca ttttcggcgc gaaaggcgac	60
cttgcgcgtc gtaaattgct gccttccctg tatcaactgg aaaaagccgg tcagctcaac	120
ccggacaccc ggattatcgg cgtagggcgt gctgactggg ataaagcggc atatacaaaa	180
gttgtccgcg aggcgctcga aactttcatg aaagaaacca ttgatgaagg tttatgggac	240
accctgagtg cacgtctgga tttttgtaat ctcatgttca atgacactgc tgcattcagc	300
cgtctcggcg cgatgctgga tcaaaaaaat cgtatcacca ttaactactt tgccatgccg	360
cccagcactt ttggcgcaat ttgcaaaggg cttggcgagg caaaactgaa tgctaaaccg	420
gcacgcgtag tcatggagaa accgctgggg acgtcgctgg cgacctcgca ggaaatcaat	480
gatcaggttg gcgaatactt cgaggagtgc caggtttacc gtatcgacca ctatcttgg	540
aaagaaacgg tgctgaacct gttggcgctg cgttttgcta actccctgtt tgtgaataac	600
tgggacaatc gcaccattga tcatgttag attaccgtgg cagaagaagt ggggatcgaa	660
gggcgctggg gctattttga taaagccggt cagatgcgcg acatgatcca gaaccacctg	720
ctgcaaattc tttgcatgat tgcgatgtct ccgccgtctg acctgagcgc agacagcatc	780
cgcatgaaa aagtgaagt actgaagtct ctgcgccgca tgcaccgctc caacgtacgc	840
gaaaaaacgg tacgcgggca atatactgcg ggcttcgccc agggcaaaaa agtgccggga	900
tatctggaag aagagggcgc gaacaagagc agcaatacag aaactttcgt ggcatccgc	960
gtcgacattg ataactggcg ctgggcccgt gtgccattct acctgcgtac tggtaaacgt	1020
ctgccgacca aatgttctga agtcgtggtc tatttcaaaa cacctgaact gaatctgttt	1080
aaagaatcgt ggcaggatct gccgcagaat aaactgacta tccgtctgca acctgatgaa	1140
ggcgtggata tccaggctact gaataagtt cctggccttg accacaaaca taacctgcaa	1200
atcaccaagc tggatctgag ctattcagaa acctttaatc agacgcatct ggcggatgcc	1260
tatgaacgtt tgctgctgga aacctgcgt ggtattcagg cactgtttgt acgtcgcgac	1320

gaagtgaag aagcctggaa atgggtagac tccattactg aggcgtgggc gatggacaat	1380
gatgcgccga aaccgtatca ggccggaacc tggggaccgc ttgcctcggg ggcatgatt	1440
accgctgatg gtcgttcctg gaatgagttt gagtaa	1476

<210> 9  
 <211> 1305  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> gsk from E. coli K-12 ATCC10798

<400> 9	
atgaaatttc ccggtaaacg taaatccaaa cattacttcc ccgtaaacgc acgcgatccg	60
ctgcttcagc aattccagcc agaaaacgaa accagcgcgt cctgggtagt gggatcgcg	120
caaacgcctg tcgatattga agcgaaagt gatgatgaat ttattgagcg ttatggatta	180
agcgccgggc attcactggt gattgaggat gatgtagccg aagcgcttta tcaggaacta	240
aaacagaaaa acctgattac ccatcagttt gcgggtggca ccattggtaa caccatgcac	300
aactactcgg tgctcgcgga cgaccgttcg gtgctgctgg gcgtcatgtg cagcaatatt	360
gaaattggca gttatgccta tcgttacctg tgtaacactt ccagccgtac cgatcttaac	420
tatctacaag gcgtggatgg cccgattggt cgttgcttta cgctgattgg cgagtccggg	480
gaacgtacct ttgctatcag tccaggccac atgaaccagc tgcgggctga aagcattccg	540
gaagatgtga ttgccggagc ctcggcactg gttctcacct catactggt gcgttgcaag	600
ccgggtgaac ccatgccgga agcaaccatg aaagccattg agtacgcgaa gaaatataac	660
gtaccggtgg tgctgacgct gggcaccaag tttgtcattg ccgagaatcc gcagtgggtg	720
cagcaattcc tcaaagatca cgtctctatc cttgcgatga acgaagatga agccgaagcg	780
ttgaccggag aaagcgatcc gttgttgga tctgacaagg cgctggactg ggtagatctg	840
gtgctgtgca ccgccgggcc aatcggttg tatatggcgg gctttaccga agacgaagcg	900
aaacgtaaaa cccagcatcc gctgctgccg ggcgctatag cggaattcaa ccagtatgag	960
tttagccgcg ccatgcgcca caaggattgc cagaatccgc tgcgtgtata ttgcacatt	1020
gcgccgtaca tggcggggcc ggaaaaaatc atgaacacta atggagcggg ggatggcgca	1080
ttggcagcgt tgctgcatga cattaccgcc aacagctacc atcgtagcaa cgtaccaaac	1140
tccagcaaac ataaattcac ctggttaact tattcatcgt tagcgcagggt gtgtaaatat	1200
gctaaccgtg tgagctatca ggtactgaac cagcattcac ctgctttaac gcgcggcttg	1260
ccggagcgtg aagacagcct ggaagagtct tactgggata gttaa	1305

<210> 10  
 <211> 864  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>



<223> wcfB from Bacteroides fragilisATCC25285

<400> 10  
atgttatatg taattttacg tggacgatta ggtaataatc tttttcagat agcaactgcc 60  
gcttcgttga ctacagaattt tatattttgt acagtaaata aggaccaaga gagacaggtc 120  
cttttgata aggattcttt ttttaaaaat ataaaagtta tgaagggggg tcctgatggc 180  
ataccatatt acaaagaacc attccatgaa tttagcagaa ttccttatga agaaggaaag 240  
gatctcatta ttgatggata tttccaatca gaaaagtact ttaaaagaag tgtcgtatta 300  
gatctttata gaataactga tgagctaagg aagaaaatat ggaatatttg tggaaatatt 360  
ttagaaaagg gagaaactgt gattattcat gttagaagag gtgattactt gaagctgcca 420  
catgcattac cattttgttg aaagtcatac tataagaatg ctattcaata tattggtgag 480  
gataaaatat tcattatttg tagtgatgat atcgattggg gtaaaaaaaa ctttatagga 540  
aaaagatatt acttcataga gaacactact ctttacttag atttatatat ccaatccttg 600  
tgcactcaca atattataag taatagctct tttagttagg ggggagcatg gcttaatgaa 660  
aatagtaata aaattgttat tgcacctcaa atgtggtttg gcatttctgt gaagttgggt 720  
gttagtgatt tattgcctgt cagtgggtt cgacttccta ataattatac tttaggaaga 780  
tattgttttg ctctatataa agtagttgag gactatttat taaatattct gcgattaata 840  
tggaaaagaa agaagaatat gtga 864

<210> 11  
<211> 71  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> F\_del\_lac primer

<400> 11  
cgaatggcgc aaaacctttc gcggtatggc atgatagcgc ccggaagaga gtgtaggctg 60  
gagctgcttc g 71

<210> 12  
<211> 70  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> R\_del\_lac primer

<400> 12  
tcctgcgctt tgttcattgcc ggaatgcggct aatgtagatc gctgaacttg attccgggga 60  
tccgtcgacc 70

<210> 13  
<211> 43  
<212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	P1_M15 lac primer	
<400>	13	
	aattaatcag atcccgggac catcgatgg cgcaaacct ttc	43
<210>	14	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	P2_M15 lac primer	
<400>	14	
	ggtgcgggcc acgacggcca gtgaatccgt aatca	35
<210>	15	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	P3_M15 lac primer	
<400>	15	
	tggccgtcgt ggcccgccacc gatcgcc	27
<210>	16	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	P4_M15 lac primer	
<400>	16	
	ggccgctatt gaccggggc tgtgggtcaa agaggcatga tg	42
<210>	17	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	F_Ndel_gsk primer	
<400>	17	
	ggaattccat atgaaatttc ccggtaaacg taa	33
<210>	18	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		

<223> R\_PacI\_gsk primer

<400> 18  
 cttaattaat taacgatccc agtaagactc 30

<210> 19  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> F\_NdeI\_zwf primer

<400> 19  
 ggaattccat atggcggtaa cgcaaacagc 30

<210> 20  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> R\_PacI\_zwf primer

<400> 20  
 cttaattaat tactcaaact cattccagga acg 33

<210> 21  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> F\_ NdeI\_D3fucT2 primer

<400> 21  
 ggaattccat atggatgatg atgcttttaa 30

<210> 22  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> F\_ NdeI\_infBfucT2 primer

<400> 22  
 ggaattcata tgacagatgt aacgattaaa gcttttaagg tgggtgcaaatt tggc 54

<210> 23  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> R\_KpnI\_fucT2 primer

<400> 23  
gggtaccatt aagcgttata cttttgggat ttacct 37

<210> 24  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> F\_ NdeI\_wcfB primer

<400> 24  
ggaattcata tggtatatgt aattttacgt ggacgattag g 41

<210> 25  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> R\_KpnI\_wcfB primer

<400> 25  
gggtacctca catattcttc tttcttttcc atattaatcg c 41