



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월16일  
(11) 등록번호 10-1648352  
(24) 등록일자 2016년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)  
C12P 19/02 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 15/70 (2013.01)  
C12N 9/1051 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-0156438  
(22) 출원일자 2015년11월09일  
심사청구일자 2015년11월09일  
(56) 선행기술조사문헌  
Florian Baumgartner 등. Microbial Cell  
Factories. Vol. 12, No. 40, 페이지 1-13  
(2013)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
서울대학교산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
(72) 발명자  
서진호  
서울특별시 서초구 방배로 239, 101동 903호 (방  
배동, 현대멤피스아파트)  
진영욱  
서울특별시 관악구 남부순환로220길 38, 성경오피  
스텔 1104호 (봉천동)  
(74) 대리인  
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 4 항

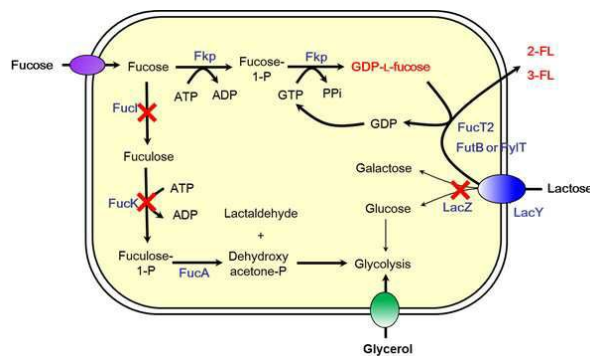
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균 및 이를 이용한 푸코실락토오스의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 푸코오스 대사효소인 푸코오스 아이소머라아제(fucose isomerase, FucI), 푸쿨로오스 키나아제(fuculose kinase, FucK) 및 푸쿨로오스 1-포스페이트 알돌라아제(fuculose 1-phosphate aldolase, FucA)를 코딩하는 유전자 중 어느 하나 이상이 과쇄되어 있고, '야생형 lac 오페론' 대신 '야생형 베타 갈락토시다아제보다 활성이 낮춰진 베타갈락토시다아제를 코딩하는 lacZ 유전자, 야생형 lacY 유전자 및 야생형 lacA 유전자로 구성된 lac 오페론' 또는 '야생형 lacZ 유전자가 완전히 제거되고, 야생형 lacY 유전자 및 야생형 lacA 유전자만으로 구성된 lac 오페론'을 보유하고 있는 푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균 및 이를 이용한 푸코실락토오스의 생산방법에 관한 것으로, 고 생산성으로 2-또는 3-푸코실락토오스를 생산할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

- C12P 19/02* (2013.01)
- C12Y 204/01065* (2013.01)
- C12Y 204/01069* (2013.01)
- C12Y 207/01051* (2013.01)
- C12Y 207/01052* (2013.01)
- C12Y 207/0703* (2013.01)
- C12Y 401/02017* (2013.01)
- C12Y 503/01025* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013M3A6A2056379
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌 프론티어사업
연구과제명	Saccharomyces cerevisiae 기반 C6/C5 통합형 바이오화학소재 생산
기여율	1/1
주관기관	서울대학교
연구기간	2015.09.01 ~ 2019.02.28

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

푸코키나아제/GDP-L-푸코오스파이로포스포릴라아제 (fucokinase/GDP-Lfucosepyrophosphorylase, Fkp)를 코딩하는 유전자 및  $\alpha$ -1,2-푸코오스 전이효소( $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자가 도입되어 있고, 푸코오스 대사효소인 푸코오스 아이소머라아제(fucose isomerase, FucI), 푸쿨로오스 키나아제 (fuculose kinase, FucK) 및 푸쿨로오스 1-포스페이트 알돌라아제 (fuculose 1-phosphate aldolase, FucA)를 코딩하는 유전자 중 어느 하나 이상에서 그 기능이 소실되도록 유전자가 파쇄되어 있으며,

야생형 *lacZ* 유전자가 완전히 제거되고, 야생형 *lacY* 유전자 및 야생형 *lacA* 유전자만으로 구성된 lac 오페론을 보유한 재조합 대장균을 이용하여, 글리세롤, 푸코오스 및 락토오스를 공급하는 유가식 배양을 통해,  $\alpha$ -1,2-푸코실락토오스를 생산하는 것을 특징으로 하는  $\alpha$ -1,2-푸코실락토오스의 생산방법.

**청구항 2**

푸코키나아제/GDP-L-푸코오스파이로포스포릴라아제 (fucokinase/GDP-Lfucosepyrophosphorylase, Fkp)를 코딩하는 유전자 및  $\alpha$ -1,3-푸코오스 전이효소( $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자가 도입되어 있고, 푸코오스 대사효소인 푸코오스 아이소머라아제(fucose isomerase, FucI), 푸쿨로오스 키나아제 (fuculose kinase, FucK) 및 푸쿨로오스 1-포스페이트 알돌라아제 (fuculose 1-phosphate aldolase, FucA)를 코딩하는 유전자 중 어느 하나 이상에서 그 기능이 소실되도록 유전자가 파쇄되어 있으며, 야생형 *lacZ* 유전자가 완전히 제거되고, 야생형 *lacY* 유전자 및 야생형 *lacA* 유전자만으로 구성된 lac 오페론을 보유한 재조합 대장균을 이용하여, 글리세롤, 푸코오스 및 락토오스를 공급하는 유가식 배양을 통해,  $\alpha$ -1,3-푸코실락토오스를 생산하는 것을 특징으로 하는  $\alpha$ -1,3-푸코실락토오스의 생산방법.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

제1항에 있어서,

상기  $\alpha$ -1,2-푸코오스 전이효소 ( $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자는, *fucT2* 유전자인 것을 특징으로 하는  $\alpha$ -1,2-푸코실락토오스의 생산방법.

**청구항 6**

제2항에 있어서,

상기  $\alpha$ -1,3-푸코오스 전이효소 ( $\alpha$ -1,3-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자는, *futB* 또는 *pylT* 유전자인 것을 특징으로 하는  $\alpha$ -1,3-푸코실락토오스의 생산방법.

**청구항 7**

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 푸코오스 대사효소인 푸코오스 아이소머라아제(fucose isomerase, FucI), 푸쿨로오스 키나아제(fuculose kinase, FucK) 및 푸쿨로오스 1-포스페이트 알돌라아제(fuculose 1-phosphate aldolase, FucA)를 코딩하는 유전자 중 어느 하나 이상이 파쇄되어 있고, '야생형 *lac* 오페론' 대신 '야생형 베타 갈락토시다아제 보다 활성이 낮춰진 베타갈락토시다아제를 코딩하는 *lacZ* 유전자, 야생형 *lacY* 유전자 및 야생형 *lacA* 유전자로 구성된 *lac* 오페론' 또는 '야생형 *lacZ* 유전자가 완전히 제거되고, 야생형 *lacY* 유전자 및 야생형 *lacA* 유전자만으로 구성된 *lac* 오페론'을 보유하고 있는 푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균 및 이를 이용한 푸코실락토오스의 생산방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 사람의 모유에는 200여 종 이상의 독특한 구조를 가지는 올리고당 (human milk oligosaccharides, HMO)이 다른 포유류의 젖에 비해 상당히 높은 농도 (5~15 g/L)로 존재한다.

[0004] HMO는 장내 유산균의 생육을 돕는 프리바이오틱 (prebiotic) 효과, 병원균 감염 예방, 면역시스템 조절 및 두뇌발달과 같이 유아의 발달 및 건강에 긍정적 영향을 미치는 등 다양한 생물학적 활성을 제공하기 때문에, 유아기 때의 모유수유는 매우 중요하다.

[0005] HMO는 D-글루코오스 (Glc), D-갈락토오스 (Gal), N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine, GlcNAc), L-푸코오스 (L-fucose, Fuc)와 시알산(sialic acid) [Sia; N-acetyl neuraminic acid (Neu5Ac)]으로 구성되어 있다.

[0006] HMO의 구조는 매우 다양하고 복잡하기 때문에, 다른 잔기와 글리코실 결합을 가지는 200개 정도의 이성질체가 서로 다른 중합도(DP 3-20)로 존재할 수 있다. 다만, 구조적 복잡성에도 불구하고, HMO는 몇 가지 공통적인 구조를 가진다.

[0007] 대부분의 HMO는 환원 말단에 락토오스 (Gal $\beta$ 1-4Glc) 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, 2-FL) 또는 3-푸코실락토오스(3'-fucosyllactose, 3-FL)의 형태로 푸코실화 (fucosylation) 될 수 있다.

[0008] 약 200개의 다른 복합 올리고당이 모유에서 발견되었는데, 함량이 가장 많은 올리고당 3가지를 포함하여 137개가 푸코실화되어 그 비율은 거의 77%이고, 남은 올리고당은 대부분은 시알화된 것(39개)으로 약 28%에 해당한다. 이 중, 특히 2-푸코실락토오스와 3-푸코실락토오스는 앞서 언급한 다양한 생물학적 활성에 관여하는 주요 HMO인 것으로 보고되어 있다.

[0009] 하지만, 여성의 약 20%에서 푸코실올리고당을 합성하는 효소에 변이가 일어나, 이를 제대로 만들지 못하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 최근 푸코실락토오스가 유아용 분유, 노인용 건강기능식품의 소재 및 의약품의 소재로 주목받고 있다.

[0010] 그러나, 현재 푸코실락토오스는 산업적으로 대량생산이 어렵기 때문에, 이들을 대신하여 유사체인 갈락토올리고당(galactooligosaccharide) 또는 프럭토올리고당(fructooligosaccharide)을 이유식에 첨가하여 유사한 효과를 기대하고 있는 실정이다.

[0011] 한편, 푸코실락토오스의 생산방법으로는 직접 모유로부터 추출하는 방법과 화학적 또는 효소적 방법으로 합성하는 방법이 있다. 직접 추출하는 방법은 모유수급의 한계와 낮은 생산성이 문제이고, 화학적 합성법은 고가의 기

질, 낮은 이성체 선택성(stereo-selectivity)과 생산수율, 독성시약 사용 등의 문제가 있다. 또한, 효소적 합성법은 푸코오스의 공여체(donor)로 이용되는 GDP-L-푸코오스가 매우 고가라는 점과 푸코오스 전이효소(fucosyltransferase)의 정제비용이 많이 든다는 문제점이 있다.

[0012] 상기와 같은 문제들로 인해 직접추출, 화학적 또는 효소적 생산법은 산업적 대량생산에 적용 불가능하였다. 하지만, 미생물을 이용한 생물공학적인 생산방법은 단순한 공정을 통해, 값싼 기질로부터 푸코실락토오스를 대량으로 생산 가능하다는 측면에서, 화학적 합성이나 효소적 합성과 같은 시스템에 비해 산업적 대량생산에 적합하다.

[0013] 미생물을 이용한 2- 또는 3-푸코실락토오스 생산에 관한 종래의 기술은 주로 신생경로(*de novo pathway*)를 통해 생성된 GDP-L-푸코오스를 이용하여 푸코실락토오스를 생산하는 방법이다. 이 방법은 비교적 저렴한 글리세롤이나 포도당 등을 기질로 이용할 수 있지만, 경로가 복잡하고, 관여하는 효소 및 보조효소들이 많아 비효율적이다. 또한, Gmd 효소가 대사산물인 GDP-L-푸코오스에 의해서 피드백 저해(feedback inhibition)를 받기 때문에 GDP-L-푸코오스의 공급에 제한이 있는 등의 단점이 있다. 또한, 회수경로(*salvage pathway*)를 통해 푸코실락토오스를 생성하는 몇몇 선행기술들이 종래에 있었지만, 생산농도가 매우 낮은 문제점이 있다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0015] (특허문헌 0001) 본 발명자들이 출원하여 등록받은 대한민국 특허등록번호 제10-1544184호(2015.08.21.)에는, 2-푸코실락토오스를 생산하기 위한 변이 미생물 및 이를 이용한 2-푸코실락토오스의 제조방법에 관한 것으로, lacZ가 변형 또는 제거된 오페론 도입 및 FucT2 또는 이의 변이체를 코딩하는 유전자, G6PDH(glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 GSK(guanosine-inosine kinase)를 코딩하는 유전자로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 유전자가 도입 또는 증폭되어 있는 변이 미생물 및 이를 이용하여 2-푸코실락토오스를 제조하는 방법이 기재되어 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0016] 본 발명에서는, 푸코실락토오스 생산을 위한 회수경로(*salvage pathway*)의 재해석을 통해, 상기 본 발명자들이 등록받은 특허의 푸코실락토오스 생산수율 및 생산성을 한층 향상시킬 수 있는 새로운 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0018] 본 발명은 푸코키나아제/GDP-L-푸코오스파이로포스포릴라아제(fucokinase/GDP-L-fucosepyrophosphorylase, Fkp)를 코딩하는 유전자 및 α-1,2-푸코오스 전이효소(α-1,2-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자가 도입되어 있어 α-1,2-푸코실락토오스를 생산할 수 있는 재조합 대장균에 있어서, 푸코오스 대사효소인 푸코오스 아이소머라아제(fucose isomerase, FucI), 푸쿨로오스 키나아제(fuculose kinase, FucK) 및 푸쿨로오스 1-포스페이트 알돌라아제(fuculose 1-phosphate aldolase, FucA)를 코딩하는 유전자 중 어느 하나 이상이 과체되어 있는 것을 특징으로 하는 α-1,2-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균을 제공한다. 이때, 상기 α-1,2-푸코오스 전이효소(α-1,2-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자는, 일 예로 *fucT2* 유전자일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 푸코키나아제/GDP-L-푸코오스파이로포스포릴라아제(fucokinase/GDP-L-fucosepyrophosphorylase, Fkp)를 코딩하는 유전자 및 α-1,3-푸코오스 전이효소(α-1,3-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자가 도입되어 있어 α-1,3-푸코실락토오스를 생산할 수 있는 재조합 대장균에 있어서, 푸코오스 대사효소인 푸코오스 아이소머라아제(fucose isomerase, FucI), 푸쿨로오스 키나아제(fuculose kinase, FucK) 및 푸쿨로오스 1-포스페이트 알돌라아제(fuculose 1-phosphate aldolase, FucA)를 코딩하는 유전자 중 어느 하나 이상이 과체되어 있는 것을 특징으로 하는 α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균을 제공한다. 이때, 상기 α-1,3-푸코오스 전이효소(α-1,3-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자는, 일 예로 *futB* 또는 *pylT* 유전자일 수 있다.

[0020] 본 발명은 α-1,2 또는 α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균에 관한 것이다. 야생형 대장균의 경우, 푸

코실락토오스를 생산할 수 없기 때문에 푸코실락토오스를 생산하기 위해서는 이들 생산에 필요한 효소를 도입시켜 주어야 한다. 여러 문헌 (Hufner, E., et al. (2009), WIPO patent 2010070104. WO2010070104 A1., Baumgartner, F., et al. (2013). *Microbial Cell Factories* 12(1): 40.)에, 푸코키나아제/GDP-L-푸코오스피로포스포릴라아제 (fucokinase/GDP-L-fucosepyrophosphorylase, Fkp)를 코딩하는 유전자 및  $\alpha$ -1,2- 또는  $\alpha$ -1,3-푸코오스 전이효소를 도입시켜 푸코실락토오스를 생산한 보고가 있었다. 하지만, 상기 유전자들을 구축시킨 제조합 대장균을 이용할 경우, 푸코실락토오스의 생산수율 및 생산성이 현저히 낮은 문제가 있었다.

[0021] 본 발명에서는 이와 같은 문제를 해결하고자 예의노력하였는데, 푸코오스 대사효소인 푸코오스 아이소머라아제 (fucose isomerase, FucI), 푸쿨로오스 키나아제 (fuculose kinase, FucK) 및 푸쿨로오스 1-포스페이트 알돌라아제 (fuculose 1-phosphate aldolase, FucA)를 코딩하는 유전자 중 어느 하나 이상을 파쇄하면, 푸코실락토오스의 생산수율 및 생산성이 높아지는 것을 확인하였다.

[0022] 푸코오스는 도 2에서 보듯이, 푸코오스 아이소머라아제(fucose isomerase, FucI), 푸쿨로스 키나아제 (FucK), L-푸쿨로스-1-포스페이트 알돌라아제(FucA)의 연속반응에 의해서 대사되어 세포생장에 이용된다. 따라서, *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 파쇄시키면, 해당과정(glycolysis)으로의 경로가 차단되어, 세포생장이 감소하는 대신, 2-푸코실락토오스의 생산수율이 향상될 것이라 예상하였다. 예상대로 본 발명에서는 일 실시예로 수행한 *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 파쇄 실험을 통해, 2-푸코실락토오스의 생산수율이 향상됨을 확인할 수 있었다 (하기 실험에서 *fucA* 유전자 파쇄실험은 수행하지 않았으나, 도 2를 참조하자면 *fucA* 유전자를 파쇄하여도 푸코오스의 해당과정(glycolysis)이 차단되는 동일한 효과가 나오기 때문에 동일한 결과가 나올 것으로 예상된다).

[0023] 그런데, 세포성장 측면에서는 세포생장이 낮아질 것이라는 예상과는 다르게 *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 파쇄시킨 균주에서, 파쇄시키지 않은 균주들에 비해서 세포성장속도가 오히려 빨라진 현상이 관찰되었다(도 5a). 대조균 균주에서는 푸코오스의 첨가가 세포생장을 저해하는 현상을 보였으나, *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 파쇄시킨 균주에서는 세포생장의 저해가 다시 회복되는 현상을 관찰할 수 있었다(도 5b). 즉, 도 2에서 볼 수 있듯이 *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 파쇄시키면, 해당과정으로 가는 대사 흐름이 차단되어 미생물의 생육이 저하될 것으로 예상되나, 실제 실험에서는 그 반대로 미생물의 생육이 촉진되는 결과가 나온 것이다.

[0024] 이 현상을 더욱 구체적으로 확인해보고자 대조균 균주와 *fucI-fucK* 유전자 클러스터 파쇄 균주를 각각 '글리세롤'과 '글리세롤/푸코오스'를 첨가한 배지에서 배양해 보았는데, 대조균 균주에서는 푸코오스의 첨가가 세포생장을 저해하는 현상을 보였고, *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 파쇄시킨 균주에서는 세포생장의 저해가 다시 회복되는 현상을 관찰할 수 있었다(도 5b).

[0025] 종합적으로, 본 발명에서는 *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 파쇄가 2-푸코실락토오스의 생산수율뿐만 아니라 세포성장속도도 증가시켰고, 이는 2-푸코실락토오스 생산성의 현저한 향상이라는 예상치 못한 결과로 이어졌음을 확인할 수 있었다.

[0026] 한편, 상기 본 발명의 제조합 대장균은, 바람직하게 '야생형 *lac* 오페론' 대신, '야생형 베타 갈락토시다아제보다 활성이 낮춰진 베타갈락토시다아제를 코딩하는 *lacZ* 유전자, 야생형 *lacY* 유전자 및 야생형 *lacA* 유전자로 구성된 *lac* 오페론' 또는 '야생형 *lacZ* 유전자가 완전히 제거되고, 야생형 *lacY* 유전자 및 야생형 *lacA* 유전자만으로 구성된 *lac* 오페론'을 보유하고 있는 것이 좋다. 이때, 상기 야생형 베타 갈락토시다아제보다 활성이 낮춰진 베타갈락토시다아제를 코딩하는 *lacZ* 유전자는, 일 예로 서열번호 5에 기재된 유전자일 수 있다.

[0027] 하기 본 발명의 실험에 의할 경우, '*lacZlacYlacA*'로 구성되는 *lac* 오페론에서, *lacZ* (베타-갈락토시다아제 코딩 유전자)의 활성을 야생형보다 낮추거나, 완전히 제거하면, 푸코실락토오스의 생산수율 및 생산성이 현저히 향상하는 것을 확인할 수 있었다. 베타-갈락토시다아제의 역할을 크게 감소 또는 제거시킴으로써 세포 내로 들어온 대부분의 락토오스(lactose)가 세포생장이 아닌 2-푸코실락토오스의 생산에 이용되도록 대사의 흐름을 전환시킨 전략이 성공한 것이다.

[0028] 한편, 본 발명은 푸코오스 및 락토오스가 함유된 배지에 상기 본 발명의 제조합 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 푸코실락토오스의 생산방법을 제공한다. 이때, 상기 배지는 바람직하게 균체 성장을 위한 탄소원으로 글리세롤을 포함하고 있는 것이 좋다. 포도당을 사용하면 이화대사억제(catabolite repression) 현상이 일어나, 락토오스의 세포 내로의 유입이 차단되나, 글리세롤을 사용하면, 이와 같은 현상이 발생하지 않아, 락토오스의 세포 내로의 유입이 가능하게 된다. 상기 사항 외에 대장균 배양에 관한 세부 지엽적 기술들은 당업계의 공지 기술을 사용할 수 있으므로, 이에 대해서는 그 기재를 생략하기로 한다.



[0029] 또한, 상기 본 발명의 푸코실락토오스의 생산방법은, 글리세롤을 추가로 공급하는 유가식 배양으로 수행되는 것이 좋다. 유가식 배양을 통해 글리세롤을 지속적으로 공급하면, 세포의 성장을 더욱 증대시켜 고생산성으로 푸코실락토오스를 생산할 수 있다. 유가식 배양에 관한 세부 지엽적 기술들 역시 당업계의 공지 기술을 사용할 수 있으므로, 이에 대해서는 그 기재를 생략하기로 한다.

**발명의 효과**

[0031] 본 발명에 따른 재조합 대장균 및 이를 이용한 푸코실락토오스 생산방법에 의하면, 생산농도가 낮아 산업적 측면에서 적용이 불가능하던 종래기술의 제약을 극복하고, 매우 높은 농도로 2-또는 3-푸코실락토오스를 생산할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0033] 도 1a는 2-푸코실락토오스(2'-fucosyllactose, 2-FL), 도 1b는 3-푸코실락토오스(3'-fucosyllactose, 3-FL)의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 내인성(야생형) *lac* 오페론을 *lacZ*가 없는 *lac* 오페론(*lacYA*)으로 교체하고, *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 파쇄시킨 재조합 대장균에서, GDP-L-푸코오스 및 푸코실락토오스를 생합성 하기 위해 회수경로(*salvage pathway*)를 도입한 대사경로 나타낸 것이다.

도 3은 *lac* 오페론을 조작한 재조합 대장균 균주를 구축하기 위한 과정을 나타낸 모식도이다[(a) 야생형 대장균 - BL21star(DE3), (b) *lac* 오페론을 제거한 대장균 - ΔL, (c) *lac*ΔM15 (변형된 *lacZ* 및 야생형 *lacYA*)를 도입한 대장균 - ΔL M15, (d) *lacYA* (*lacZ* 없음)를 도입한 대장균 - ΔL YA].

도 4는 재조합 대장균 균주들의 회분식 배양결과를 나타낸 것으로, OD<sub>600</sub>가 약 0.8에 도달하면, IPTG와 락토오스, 푸코오스를 최종 농도가 각각 0.1 mM, 10 g/L, 10 g/L (화살표)이 되도록 첨가하였다: (a) BL21star(DE3)+pHfucT2fkp, (b) ΔL+pHfucT2fkp, (c) ΔL M15+pHfucT2fkp, (d) ΔL YA+pHfucT2fkp, (e) ΔLF M15+pHfucT2fkp, (f) ΔLF YA+pHfucT2fkp. 도 4에서 수치는 3개의 독립적 회분배양의 평균값과 표준편차를 나타낸다. ●: 건조세포중량, ■: 락토오스, ★: 푸코오스, ◆: 글리세롤, ▲: 2-푸코실락토오스.

도 5에서, a는 도 4의 회분식 배양결과에서 각 균주들의 세포생장곡선만을 종합하여 나타낸 것이고, b는 ΔL YA와 ΔLF YA 균주들을 각각 글리세롤과 글리세롤/푸코오스가 첨가된 최소배지에서 배양한 세포생장곡선을 나타낸 것이다.

도 6에서 a는 ΔL M15+pHfucT2fkp의 유가식 배양결과를 나타낸 것이고, b는 ΔLF YA+pHfucT2fkp의 유가식 배양결과를 나타낸 것이다. 초기에 투입한 20 g/L 글리세롤이 모두 소모된 후, 글리세롤을 pH-stat으로 공급하기 시작하였고, IPTG, 락토오스, 푸코오스를 동시에 첨가하였다(큰 화살표). 락토오스 고갈 후 200 g/L 락토오스 용액을 추가로 투입하였다(작은 화살표). ●: 건조세포중량, ■: 락토오스, ★: 푸코오스, ◆: 글리세롤, ▲: 2-푸코실락토오스.

도 7에서, a는 ΔL YA+pHfucT2fkp의 유가식 배양결과를 나타낸 것이고, b는 ΔL YA+pHfucT2fkp의 유가식 배양결과를 나타낸 것이다. 초기에 투입한 20 g/L 글리세롤이 모두 소모된 후, 글리세롤을 pH-stat으로 공급하기 시작하였고, IPTG, 락토오스, 푸코오스를 동시에 첨가하였다(큰 화살표). ●: 건조세포중량, ■: 락토오스, ★: 푸코오스, ◆: 글리세롤, ▲: 3-푸코실락토오스.

도 8은 ΔL M15+pHfucT2fkp의 배양액을 LC-MS/MS분석을 통해 2-푸코실락토오스의 생산을 확인한 결과이다. a는 MALDI-TOP MS를 이용해서 양이온 모드에서 분자량을 통해 푸코실락토오스의 생성을 확인한 것이고, b는 Tandem mass spectrometry (MS/MS)를 이용해서 푸코실락토오스의 구조적 조성을 확인한 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0034] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0036] [실시예 1: 재조합 균주 및 플라스미드 제작]

[0037] 플라스미드 제작 및 푸코실락토오스(fucosyllactose, FL)의 생산을 위해 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) TOP10과 BL21star(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 각각 이용하였다.

[0038] 제조합 대장균에 외래 유전자인 *fkp*와 *fucT2* ( $\alpha$ -1,2-푸코오스 전이효소)를 도입하기 위해 pHfucT2fkp 플라스미드를 제작하고자 하였다 (도 1 참조). 먼저, 박테로이데스 프라질리스 (*Bacteroides fragilis*) (ATCC25285)의 유전체 DNA로부터 두 개의 DNA 프라이머 (F\_*NdeI*-fkp와 R\_*PacI*-fkp)를 이용한 PCR 반응을 통해 *fkp* 유전자를 증폭하였고, 제한효소 *NdeI*과 *PacI*을 처리한 후 동일한 제한효소가 처리된 pHfucT2플라스미드(Lee, W. H., et al. (2012). Microbial Cell Factories 11(1): 48.)에 이를 삽입시킴으로써 pHfucT2fkp를 구축하였다.

[0039] 또한, pHfkppy1T와 pHfkpfutB를 구축하고자 하였다 (도 1 참조). 먼저, 박테로이데스 프라질리스 (*Bacteroides fragilis*) (ATCC25285)의 유전체 DNA로부터 두 개의 DNA 프라이머 (F\_*NcoI*-fkp와 R\_*SacI*-fkp)를 이용해서 *fkp* 유전자를 증폭하였고, 제한효소 *NcoI*과 *SacI*을 처리한 후 동일한 제한효소가 처리된 pCOLADuet-1 플라스미드 (Novagen)에 이를 삽입시킴으로써 pHfkp를 구축하였다. 이후, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) NCTC11637 (ATCC43504) 및 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) 26695 (ATCC 700392)의 유전체 DNA 각각으로부터 두 쌍의 프라이머 [(F\_*NdeI*-py1T와 R\_*KpnI*-py1T), (F\_*NdeI*-futB와 R\_*KpnI*-futB)]를 이용하여,  $\alpha$ -1,3-푸코오스 전이효소를 코딩하는 *py1T*와 *futB* 유전자를 각각 증폭하였고, 각각 *NdeI*과 *KpnI*을 처리한 후, 같은 제한효소로 자른 pHfkp에 삽입시켜서 pHfkppy1T와 pHfkpfutB를 각각 구축하였다. 본 실시예 중 사용된 유전자 서열은 다음과 같았다.

**표 1**

유전자 및 유전자 서열

[0040]

유전자명	서열번호
<i>fkp</i>	서열번호 1
<i>fucT2</i>	서열번호 2
<i>py1T</i>	서열번호 3
<i>futB</i>	서열번호 4

[0042] 한편, pG1acZ $\Delta$ M15를 제작하기 위해, 2쌍의 프라이머 'P1\_M15 lac/ P2\_M15 lac'와 'P3\_M15 lac/P4\_M15 lac'을 사용하여 *E. coli* K-12 (ATCC10798)의 게놈 DNA로부터 각각 2개의 DNA 단편을 증폭하였다. 또한, pG1acYA를 제작하기 위해, 2쌍의 프라이머 'P1\_M15 lac/P2\_lacYA'와 'P3\_lacYA/P4\_M15 lac'를 사용하여 2개의 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편들을 'In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA, Japan)'을 사용하여 각각 *SmaI*이 처리된 pGRG36에 삽입하였고, 그 결과, pG1acZ $\Delta$ M15 (변형된 *lacZ* 및 야생형 *lacYA* 보유)과 pG1acYA (*lacZ* 결실 및 야생형 *lacYA* 보유)가 구축되었다. 변형된 '*lacZ* 및 *lacYA*'로 구성된 핵산서열은 서열번호 5와 같았고, '*lacZ*가 결실되고 야생형 *lacYA*'로 구성된 핵산서열은 서열번호 6과 같았다.

[0043] 상기에서 제조한 모든 구조체는 제한효소 처리 및 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다. 내인성(야생형) *lac* 오페론 또는 *fucI*-*fucK*클러스터를 결실시키기 위해, 플라스미드 pKD46, pKD13 및 pCP20을 사용하는 ' $\lambda$ -red mediated deletion' 방법 (Datsenko et al. (2000) Proceedings of the National Academy of Sciences 97(12):6640)을 이용하였다. 또한, 트랜스포존을 이용하여 내인성(야생형) *lac* 오페론이 결실된 대장균의 게놈 염색체 상으로 *lacZ* $\Delta$ M15 또는 *lacYA*를 삽입하는 과정은 'McKenzie et al. (2006) BMC microbiology 6(1):39'의 방법을 이용하였다.

[0044] 사용된 모든 균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오티드를 표 2 및 3에 기재하였다.

**표 2**

균주 및 플라스미드

[0045]

균주	관련된 특징
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> ( <i>mrr</i> - <i>hscRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <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>hscSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)
$\Delta$ L	BL21star(DE3) $\Delta$ <i>lacZYA</i>
$\Delta$ L M15	BL21star(DE3) $\Delta$ <i>lacZYA</i> <i>Tn7::lacZ</i> $\Delta$ M15YA



ΔL YA	BL21star(DE3) Δ <i>lacZYA Tn7::lacYA</i>
ΔLF M15	ΔL <i>fucIK Tn7::lacZΔM15YA</i>
ΔLF YA	ΔL <i>fucIK Tn7::lacYA</i>
<b>플라스미드</b>	<b>관련된 특징</b>
pCOLADuet-1	Two T7 promoters, ColA replicon, Kan <sup>R</sup>
pGRG36	Tn7 insertion vector, pSC101 replicon, Amp <sup>R</sup>
pHfucT2fkp	pCOLADuet-1 + <i>fucT2 (NcoI/SacI)</i> + <i>fkp (NdeI/PacI)</i>
pHfkipylT	pCOLADuet-1 + <i>fkp (NcoI/SacI)</i> + <i>pylT (NdeI/KpnI)</i>
pHfkipfutB	pCOLADuet-1 + <i>fkp (NcoI/SacI)</i> + <i>futB (NdeI/KpnI)</i>
pGlacZM15	pGRG36+ <i>lacZM15 (SmaI)</i>
pGlacYA	pGRG36+ <i>lacYA (SmaI)</i>

**표 3**

사용된 프라이머

[0047]

프라이머 이름	서열(5'→3')	비고
F_ <i>NdeI</i> _ <i>fkp</i>	GGAATTCCATATGCAAAACTACTATCTTTACCG	
R_ <i>PacI</i> _ <i>fkp</i>	CTTAATTAATTATGATCGTGATACTTGG	
F_ <i>NdeI</i> _ <i>pylT</i>	GGAATTCCATATGTTCCAACCCCTATTAGACGC	
R_ <i>KpnI</i> - <i>pylT</i>	GGGGTACCTTATTTTTTAACCCACCTCCTATTA	
F_ <i>NdeI</i> _ <i>futB</i>	GGAATTCCATATGTTCCAACCCCTATTAGACGC	
R_ <i>KpnI</i> - <i>futB</i>	GGGGTACCTTACAACCCAATTTTTTAACCAAC	
P1_M15 <i>lac</i>	AATTAATCAGATCCCGGACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTC	
P2_ <i>lacYA</i>	TGGATTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCC	
P3_ <i>lacYA</i>	AATTTACACAGGAAATCCATTATGTAATAAATAACCAAACTTTTGG	
P4_M15 <i>lac</i>	GGCCGCTATTGACCCGGGGCTGTGGGTCAAAGAGGCATGATG	
F_ <i>Tn7</i>	GATGCTGGTGGCGAAGCTGT	
R_ <i>Tn7</i>	GATGACGGTTTGTACATGGA	
F_ <i>del_fucIK</i>	CCTTCTCCGCCTTAGCAGAGCGCCAATAAAGCGAGATGAGGAATCCTG GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	
R_ <i>del_fucIK</i>	GCACTTCAATAGTTTCGGGAGAAATTAACGGCGAAATGTTTTTCAGCATT ATTCCGGGGATCCGTCGACC	
F_ <i>ch_fucIK</i>	AAGCGAGATGAGGAATCCTG	
R_ <i>ch_fucIK</i>	CGGCGAAATGTTTTTCAGCATT	
* 이탤릭체로 표시된 서열은 특정 제한효소의 인지 부위를 나타냄		
* 밑줄 표시 서열은 <i>E. coli</i> 염색체에서 <i>fucIK</i> 유전자 클러스터의 상동 재조합 부위를 의미함		

[0049]

**[실시예 2: 배양조건 및 방법]**

[0050]

종균배양에는 적절한 항생제 (kanamycin 50 μg/mL)가 포함된 5 mL의 LB (Luria-Bertani) 배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride)가 담긴 시험관을 이용하였고, 온도는 37°C, 교반속도를 250 rpm으로 유지하며 12시간 배양하였다.

[0051]

발효기용 전배양 및 회분식 배양에는 100 mL의 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), pH6.8)가 담긴 500 mL 들이의 플라스크 (baffled flask)에서 25°C, 교반속도를 250 rpm으로 유지하며 배양하였다. 회분식 배양시에는 OD<sub>600</sub>가 0.8에 도달한 시점에서 IPTG (isopropyl-β-dthiogalactopyranoside), 락토오스 및 푸코오스를 최종 농도가 각각 0.1 mM, 10 g/L 및 10 g/L가 되도록 첨가하였다.

[0052]

고농도 세포배양을 위한 유가식 배양은 20 g/L의 글리세롤 및 적절한 항생제(kanamycin 50 μg/mL)를

포함하는 1.0 L의 최소배지를 포함하는 2.5 L 들이의 바이오리액터 (Kobiotech, Incheon, Korea)에서 실시하였다.

[0053] 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. 이와 동시에, T7 프로모터-매개 유전자 발현을 유도하기 위해 IPTG, 락토오스 및 푸코오스를 최종 농도가 0.1 mM, 25 g/L, 25 g/L가 되도록 첨가하여 2- 또는 3-푸코실락토오스를 생산하였다.

[0054] pH-stat 방법을 위해, pH가 글리세롤 고갈로 설정 포인트보다 더 높아지면, 반응기 중에서 적정량의 유입용액이 자동으로 공급되도록 하였다. 또한, 배지의 pH가 설정포인트(set-point)보다 더 낮아지면 28% NH<sub>4</sub>OH가 자동으로 첨가되어 pH가 일정범위 내 (pH 6.78~6.82)에서 유지되도록 하였다. 배지의 pH는 pH 전극 (Mettler Toledo, USA)을 사용하여 실시간으로 측정되었다. 교반속도 및 통기속도는 산소결핍을 방지하기 위하여 각각 1000 rpm과 2 vvm으로 유지하였다.

[0056] [실시예 3: 세포 및 대사산물의 농도 결정]

[0057] 광학밀도(optical density, OD) 및 미리 측정된 변환 상수 0.36을 통해 건조세포중량을 측정하였다. 광학밀도(OD)는 샘플을 적절하게 희석하여 광학밀도(OD)를 0.1~0.5 사이의 범위에 맞춘 후에 스펙트로포토미터 (Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다.

[0058] 2-푸코실락토오스, 3-푸코실락토오스, 락토오스, 푸코오스, 글리세롤 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 °C에서 가열된 컬럼을 적용하여 10배 희석된 20 μl의 배양 배지를 분석하였다. 0.6 mL/min 유속으로 5 mM의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 이동상으로 사용하였다.

[0060] [시험예 1: *lac* 오페론의 조작이 회수경로(*salvage pathway*)를 통한 2-푸코실락토오스의 생산에 미치는 영향의 평가]

[0061] 푸코오스, 락토오스 및 글리세롤로부터 2-푸코실락토오스를 생합성 하기 위해서 GDP-L-푸코오스 (guanosine 5'-diphosphate-L-fucose)의 회수경로(*salvage pathway*)에 관여하는 유전자인 *fkp*를 박테로이데스 프라질리스 (*Bacteroides fragilis*)로부터 클로닝하여 α-1,2-푸코오스 전이효소인 FucT2를 발현시키는 야생형 대장균(WT)에 도입하였다.

[0062] 플라스미드 pHfucT2fkp를 도입한 재조합 BL21star(DE3)의 회분식 배양결과, 락토오스가 모두 소모된 이후 글리세롤이 소모되는 전형적인 이중성장(diauxic growth)의 형태를 보였다. 첨가한 10 g/L의 락토오스가 약 41시간째에 모두 소모되었음에도 불구하고, 2-푸코실락토오스는 0.17 g/L만이 생산되었고, 락토오스 대비 2-푸코실락토오스의 수율은 0.01 mole/mole로, 푸코오스 대비 수율인 0.14 mole/mole에 비해 훨씬 낮은 수치를 보였다(도 4a, 표4).

[0063] 이러한 현상은 소모된 대부분의 락토오스가 2-푸코실락토오스의 생산에 이용되지 못하고 세포생장에 이용되었기 때문으로 사료되었는데, 이는 GDP-L-푸코오스의 신생경로(*de novo pathway*)를 통하여 2-푸코실락토오스를 생산했던 선행연구에서 나타난 것과 비슷하다 (Chin, Y.W., et al. (2015) Journal of Biotechnology 210: 107-115).

[0064] 따라서, 본 발명에서는 선행연구에서 구축되었던 ΔL M15 균주(변형된 *lacZ* 및 야생형 *lacYA* 보유)를 이용하였는데, 그 이유는 이 균주가 베타갈락토시다아제(β-galactosidase) 활성을 야생형 균주에 비하여 3%만 가지기 때문이다 (Chin, Y.W., et al. (2015) Journal of Biotechnology 210: 107-115). 이와 더불어 남아있는 베타갈락토시다아제의 활성을 완전히 제거하기 위해 ΔL YA 균주를 구축하였다. 이는 *lacZ*가 없는 *lac* 오페론을 ΔL 균주(*lac* 오페론이 제거된 균주)에 삽입하는 방식으로 구축되었다(도 3).

[0065] 앞서 구축한 세 균주(ΔL, ΔL M15, ΔL YA)에 pHfucT2fkp를 형질전환시킨 균주 3종을 이용하여 회분식 배양을 실시하였다. 이를 통해 베타갈락토시다아제(β-galactosidase)의 활성도 조절 (또는 제거)이 회수경로(*salvage pathway*)를 통한 2-푸코실락토오스의 생산에 미치는 영향을 평가했다.

[0066] 앞서 실시한 야생형 균주와는 달리, ΔL 균주(*lac* 오페론이 완전히 제거된 균주)는 락토오스 이송체 (lactose permease)가 결여되어 있기 때문에 락토오스를 전혀 소모하지 못하였고, 그에 따라 2-푸코실락토오스

도 생산하지 못하였다(도 4b).

[0067] ΔL M15균주의 경우 0.93 g/L의 2-푸코실락토오스를 생산하였고, 락토오스 대비 수율은 0.10 mole 2-푸코실락토오스/mole 락토오스를 나타냈는데, 이는 야생형 균주에 비하여 농도와 수율이 각각 5.5배와 9.1배가 향상된 수치였다(도 4c, 표 4).

[0068] 반면, ΔL YA균주의 경우에는 락토오스 대비 2-푸코실락토오스의 수율이 0.43 mole/mole, 농도가 0.81 g/L로 ΔL M15균주와 비교하여 수율이 약 4배 향상되었다(도 4d, 표 4).

[0069] 이상의 결과를 종합해보면, 재조합 대장균을 이용하여 회수경로(*salvage pathway*)를 통한 2-푸코실락토오스의 생산시에 *lacZ*의 활성도를 감소(또는 제거)시키면, 2-푸코실락토오스의 생산이 향상됨을 확인하였고, 락토오스 이송체를 남겨둔 채로 락토오스 대사능을 제거하는 것이 2-푸코실락토오스의 생산에 중요한 것으로 판단되었다. 회분식 배양의 결과는 표 4에 요약하였다.

**표 4**

[0070] 재조합 대장균들을 이용한 회분식 배양결과 요약

균주명	최종 건조 세포 중량 (g/L)	락토오스 소모량 <sup>a</sup> (g/L)	푸코오스 소모량 <sup>a</sup> (g/L)	최대 2-푸코실락토오스 농도 <sup>a</sup> (g/L)	수율 (mole 2-푸코실락토오스 /mole 락토오스)	수율 (mole 2-푸코실락토오스 /mole 푸코오스)	생산성 <sup>a</sup> (g/L/h)
WT pHfucT2fkp	4.35±0.14	10.57±0.06	0.40±0.06	0.17±0.05	0.011 ±0.003	0.137 ±0.022	0.003 ±0.001
ΔL pHfucT2fkp	4.83±0.78	0	0.62±0.03	N.D.	-	-	-
ΔL M15 pHfucT2fkp	4.48±0.46	6.56±0.16	1.00±0.16	0.93±0.24	0.100 ±0.028	0.310 ±0.033	0.019 ±0.005
ΔL YA pHfucT2fkp	4.83±0.01	1.36±0.30	0.77±0.06	0.81±0.10	0.433 ±0.146	0.351 ±0.014	0.016 ±0.02
ΔLF M15 pHfucT2fkp	5.36±0.45	4.16±0.33	1.11±0.03	2.08±0.18	0.351 ±0.003	0.631 ±0.072	0.056 ±0.005
ΔLF YA pHfucT2fkp	5.20±0.13	2.59±0.49	0.95±0.27	1.85±0.10	0.508 ±0.069	0.677 ±0.156	0.073 ±0.004

<sup>a</sup> 락토오스와 푸코오스, 2-푸코실락토오스의 농도는 배지에 있는 것만을 정량한 수치임.  
모든 수치는 초기에 첨가해 준 20 g/L의 글리세롤이 모두 소모된 시점을 기준으로 정량하였음.

[0072] [시험예 2: *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 추가 파쇄가 세포생장속도 및 2-푸코실락토오스의 생산에 미치는 영향의 평가]

[0073] 도 2에 도시한 바와 같이, L-푸코오스는 대장균 내에서 L-푸코오스 아이소머라아제(FucI), L-푸콜로스 키나아제(FucK), L-푸콜로스-1-포스페이트 알돌라아제(FucA)의 연속반응에 의해서 대사되어 세포생장에 이용된다. 따라서, *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 파쇄시키면, 세포생장이 감소하는 대신 2-푸코실락토오스의 생산수율이 향상될 것이라 예상하였다.

[0074] 이러한 가설을 확인하고자, *lacZ*의 활성도를 감소시킨 균주(ΔL M15)와 *lacZ*의 활성을 제거한 균주(ΔL YA)의 게놈 염색체 상에서 *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 파쇄하였고, 그 결과 ΔLF M15와 ΔLF YA 균주가 구축되었다.

[0075] ΔLF M15에 pHfucT2fkp를 형질전환시킨 균주를 회분식 배양한 결과, 2.1 g/L 농도의 2-푸코실락토오스가 생산되었고, 락토오스 대비 2-푸코실락토오스의 생산수율은 0.35 mole/mole, 푸코오스 대비 생산수율은 0.63 mole/mole이었다. 이러한 수치들은 ΔL M15 균주에 비하여 각각 2.2배, 3.5배, 2.0배가 향상된 수치이다(도 4e, 상기 표 4).

[0076] 이와 비슷하게, ΔL YA 균주에서도 *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 파쇄는 2-푸코실락토오스의 생산수율을 향상시켰다. pHfucT2fkp로 형질전환된 ΔLF YA 균주의 회분식 배양결과, 1.9 g/L 농도의 2-푸코실락토오스가

생산되었고, 락토오스 대비 2-푸코실락토오스의 생산수율은 0.51 mole/mole, 푸코오스 대비 생산수율은 0.68 mole/mole이었다. 이러한 수치들은  $\Delta$ L YA 균주에 비하여 각각 230%, 17%, 93%가 향상된 것이다(도 4f, 상기 표 4).

[0077] 이를 종합해 보면, 앞서 예상했던 대로 *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 과쇄로 인해 2-푸코실락토오스의 생산수율이 향상되었고, 이러한 향상은 푸코오스 대사효소의 제거에 의해 세포 내에서 2-푸코실락토오스의 생산에 이용할 수 있는 푸코오스의 양이 많아졌기 때문으로 사료된다.

[0078] 한편, 앞선 예상과는 다르게 *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 과쇄시킨 균주( $\Delta$ LF M15와  $\Delta$ LF YA)는 과쇄시키지 않은 균주들에 비해서 세포생장속도가 오히려 빨라졌다(도 5a). 이 현상을 확인해보고자  $\Delta$ L YA균주와  $\Delta$ LF YA균주를 각각 글리세롤(glycerol)과 글리세롤/푸코오스를 첨가한 배지에서 배양해 보았다.

[0079] 도 5b에서 볼 수 있듯이, 대조균 균주( $\Delta$ L YA)에서는 푸코오스의 첨가가 세포생장을 저해하는 현상을 보였고, *fucI-fucK* 유전자 클러스터를 과쇄시키면 세포생장의 저해가 다시 회복되는 현상을 관찰할 수 있었다.

[0080] 종합적으로, *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 과쇄는 2-푸코실락토오스의 생산수율뿐만 아니라 세포생장속도도 증가시켰고, 이는 2-푸코실락토오스의 생산성 향상이라는 예상치 못한 결과로 이어졌다.

[0082] [시험예 3: 유가식 배양을 통한 2-푸코실락토오스의 생산]

[0083] 고농도 세포배양을 통하여 고농도의 2-푸코실락토오스를 생산하기 위해 'pHfucT2fkp를 형질전환시킨  $\Delta$ L M15 균주'를 이용하여 2.5 L 수준의 발효기에서 유가식 배양을 실시했다(도 6의 a). 초기에 첨가해준 20 g/L의 글리세롤을 모두 소모한 시점부터 세포생장을 유지하기 위해 피딩용액(feeding solution)을 pH-stat 방식으로 공급하였다(도 6의 a). 이와 동시에 2-푸코실락토오스의 생산을 유도하기 위해 IPTG를 넣고, 락토오스와 푸코오스도 같이 첨가해 주었다. 발효가 진행되는 동안 아세트산은 생성되지 않았다. 글리세롤의 대사를 통해 세포는 건조세포중량 59.0 g/L에 도달하였다. 또한, 2-푸코실락토오스의 농도는 20.6 g/L, 락토오스 대비 생산수율은 0.27 mole/mole이고, 푸코오스 대비 생산수율은 0.26 mole/mole, 생산성은 0.32 g/L/h를 얻을 수 있었다. 20.6 g/L의 2-푸코실락토스 생산농도는 선행연구에서 동일한 조건하에서 신생경로(*de novo pathway*)를 통해 글리세롤과 락토오스로부터 생산한 2-푸코실락토오스 농도보다 8배가 높은 수치이다(Chin, Y.W., et al. (2015) Journal of Biotechnology 210: 107-115)..

[0084] 이러한 향상은 신생경로(*de novo pathway*)의 경우, 관여하는 효소 및 보조효소들이 많아 비효율적이고, 경로 중간의 Gmd 효소가 산물인 GDP-L-푸코오스에 의해서 되먹임 저해(feedback inhibition)를 받기 때문에 GDP-L-푸코오스의 공급에 제한이 있는 반면, 회수경로(*salvage pathway*)는 이러한 단점들이 없어 더 효율적인 경로이기 때문에 가능했기 때문으로 사료된다.

[0085] 한편, *lacZ*의 완전과쇄와 *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 과쇄가 2-푸코실락토오스의 생산에 미치는 영향을 평가하기 위해 pHfucT2fkp를 형질전환시킨  $\Delta$ LF YA 균주를 이용하여 위와 동일한 조건에서 유가식 배양을 실시했다. 도 6에서 볼 수 있듯이 *fucI-fucK* 유전자 클러스터가 과쇄된 균주( $\Delta$ LF YA)가 그렇지 않은 균주( $\Delta$ L M15)에 비해서 빠르게 성장했고, 최종건조세포중량은 69.8 g/L에 달했다. 이는 시험예 2에서도 언급하였듯이, *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 과쇄로 인해 세포생장이 빨라졌기 때문으로 사료된다. IPTG, 락토오스, 푸코오스를 첨가해 준 이 후, 배양 47시간째에 락토오스를 모두 소모하였고, 동일농도의 락토오스를 추가해주었다. 최종적으로 배지 중에 생성된 2-푸코실락토오스의 최종농도는 23.1 g/L였다. 더불어 락토오스 대비 생산수율은 0.37 mole/mole, 푸코오스 대비 생산수율은 0.36 mole/mole, 생산성은 0.39 g/L/h였는데, 이는  $\Delta$ L M15 균주에 비해서 각각 36%, 38%, 22%가 향상된 수치이다.

[0086] 따라서, 유가식 배양에서 *lacZ* 및 *fucI-fucK* 유전자 클러스터의 제거는 푸코오스, 글리세롤, 락토오스로부터 회수경로(*salvage pathway*)를 통해 2-푸코실락토오스를 생산하는데, 생산수율뿐만 아니라 세포생장 및 생산성에 긍정적인 영향을 주는 것으로 사료된다. 2-푸코실락토오스의 생산을 위한 유가식 배양의 결과는 표 5에 요약하였다.

[0087]

2-푸코실락토오스 생산을 위한 유가식 배양결과 요약

균주명	최종 건조 세포 중량 (g/L)	락토오스 소모량 <sup>c</sup> (g/L)	푸코오스 소모량 <sup>c</sup> (g/L)	최대 2-푸코실락토오스 농도 <sup>c</sup> (g/L)	수율 (mole 2-푸코실락토오스 /mole 락토오스)	수율 (mole 2-푸코실락토오스 /mole 푸코오스)	생산성 <sup>a</sup> (g/L/h)
<sup>b</sup> ΔL M15 pmBCGW pHfucT2	73.1	-	39.7	2.6	0.064	-	0.043
ΔL M15 pHfucT2fkp	59.0	27.0	53.6	20.6	0.270	0.257	0.318
ΔLF YA pHfucT2fkp	69.8	21.8	44.0	23.1	0.367	0.355	0.389

<sup>a</sup> 2-FL 생산성은 IPTG 인덕션 이 후부터 계산한 수치임.  
<sup>b</sup> ΔL M15에 pmBCGW와 pHfucT2를 형질전환한 균주의 유가식 배양결과는 'Chin, Y.W., et al. (2015) Journal of Biotechnology 210: 107-115'에 보고된 결과임.  
<sup>c</sup> 락토오스와 푸코오스, 2-푸코실락토오스의 농도는 배지에 있는 것만을 정량한 수치임.

[0089] [시험예 4: 유가식 배양을 통한 3-푸코실락토오스의 생산]

[0090] 앞서 구축된 재조합 대장균은 푸코오스, 락토오스, 글리세롤로부터 회수경로(salvage pathway)를 통해 2-푸코실락토오스를 생산할 수 있는 시스템이었다. 도 2에서 볼 수 있듯이 α-1,2-푸코오스 전이효소를 α-1,3-푸코오스 전이효소로 교체할 경우 현 시스템에서 3-푸코실락토오스를 생산할 수 있다.

[0091] 헬로코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) 유래의 α-1,3-푸코오스 전이효소를 코딩하는 유전자인 *futB*와 *pyIT*를 각각 도입하기 위해 pHfkpfutB와 pHfkppyIT를 ΔLF YA 균주에 형질전환시켰고, 두 균주를 이용하여 유가식 발효를 수행하였다(도 7).

[0092] 그 결과, 두 균주의 최종건조세포중량과 락토오스 소모량, 푸코오스 소모량은 비슷하였으나, 3-푸코실락토오스의 최종농도는 *futB*를 도입한 균주에서 11.8 g/L, *pyIT*를 도입한 균주에서 14.7 g/L로 *pyIT*를 도입한 경우가 약 25% 정도 높았다.

[0093] 이에 따라 3-푸코실락토오스의 락토오스 대비 생산수율, 푸코오스 대비 생산수율 및 생산성도 *pyIT*를 도입한 균주의 경우가 *futB*를 도입한 균주에 비해 각각 22%, 16%, 29%가 높게 나타났다. 따라서 *PyIT*의 푸코실화 활성화도(fucosylation activity)가 *FutB*보다 우수한 것으로 사료된다.

[0094] 3-푸코실락토오스의 생산을 위한 유가식 배양의 결과는 표 6에 요약하였다.

표 6

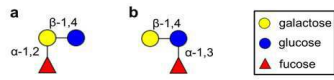
[0095] 3-푸코실락토오스 생산을 위한 유가식 배양결과 요약

균주명	최종 건조 세포 중량 (g/L)	락토오스 소모량 <sup>b</sup> (g/L)	푸코오스 소모량 <sup>b</sup> (g/L)	최대 3-푸코실락토오스 농도 <sup>b</sup> (g/L)	수율 (mole 3-푸코실락토오스 /mole 락토오스)	수율 (mole 3-푸코실락토오스 /mole 푸코오스)	생산성 <sup>a</sup> (g/L/h)
ΔLF YA pHfkpfutB	46.1	22.6	8.3	11.8	0.366	0.479	0.17
ΔLF YA pHfkppyIT	49.0	22.9	8.8	14.7	0.448	0.558	0.22

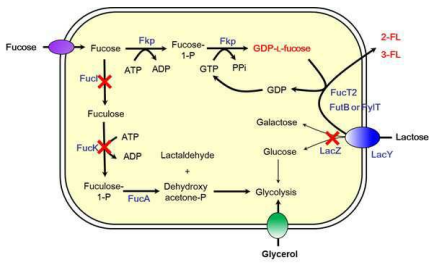
<sup>a</sup> 3-푸코실락토오스의 생산성은 IPTG 인덕션 이 후부터 계산한 수치임.  
<sup>b</sup> 락토오스와 푸코오스, 3-푸코실락토오스의 농도는 배지에 있는 것만을 정량한 수치임.

도면

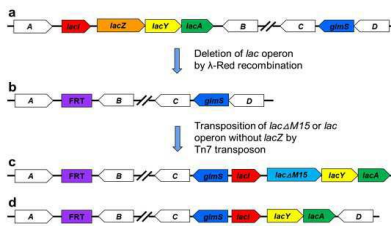
도면1



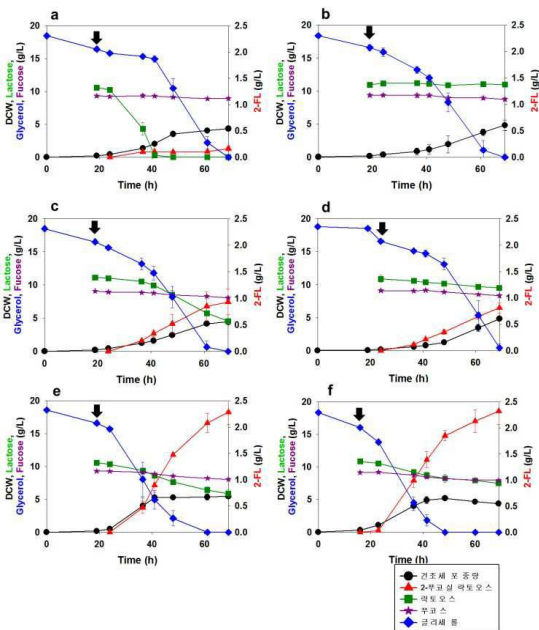
도면2



도면3

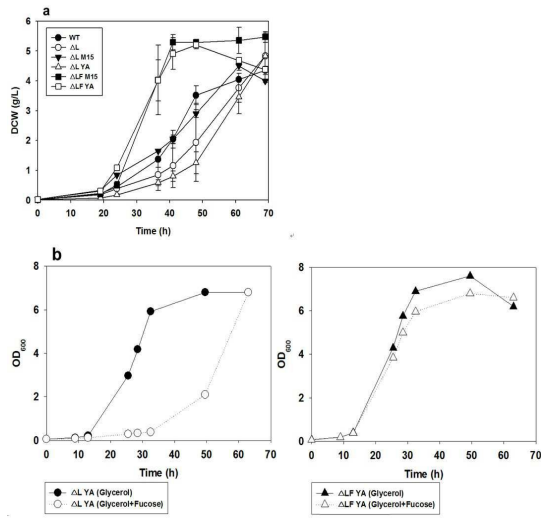


도면4

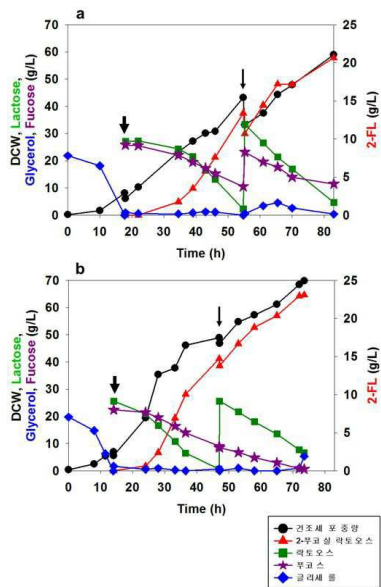




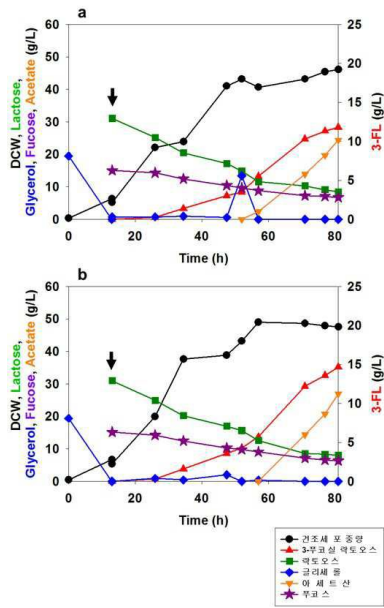
도면5



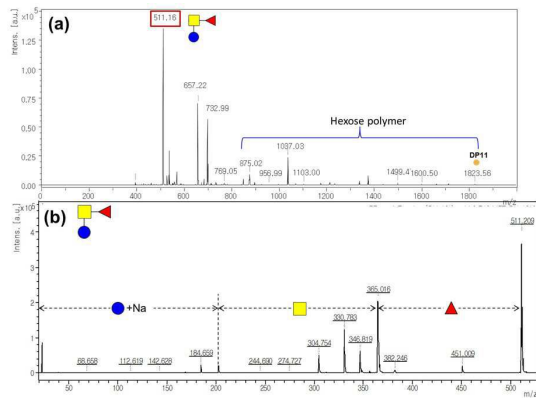
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Recombinant E. coli for the production of fucosyllactose and method for the production of fucosyllactose therefrom
- <130> AP-2015-0179
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 2850
- <212> DNA
- <213> Bacteroides fragilis ATCC25285
- <400> 1

atgcaaaaac tactatcttt accgtccaat ctggttcagt cttttcatga actggagagg 60  
 gtgaatcgta ccgattgggt ttgtacttcc gacccggtag gtaagaaact tggttccggt 120  
 ggtggaacat cctggctgct tgaagaatgt tataatgaat attcagatgg tgctactttt 180  
  
 ggagagtggc ttgaaaaaga aaaaagaatt cttcttcacg cgggtgggca aagccgtcgt 240  
 ttaccggct atgcaccttc tggaaagatt ctcaactcgg ttctgtgtt ccggtgggag 300  
 agagggaac atctgggaca aaatctgctt tctctgaac ttcacctata tgaaaaaatc 360  
 atgtctttgg ctccgataa actccataca ctgattgca gtggtgatgt ctatattcgt 420  
 tcggagaaac ctttgcagag tattcccga gcgatgtgg tttgttatgg actgtgggta 480  
 gatccgtctc tggctacca tcatggcgtg tttgcttccg atcgcaaaca tcccgaaca 540  
 ctcgacttta tgcttcagaa gccttcgttg gcagaattgg aatctttatc gaagacccat 600  
  
 ttgttctga tggacatcgg tatatggctt ttgagtacc gtgccgtaga aatcttgatg 660  
 aaacgttctc ataaagaag ctctgaagaa ctaaagtatt atgatctta tccgatttt 720  
 ggattagctt tgggaactca tcccgtatt gaagacgaag aggtcaatac gctatccgtt 780  
 gctattctgc ctttgcggg aggagagttc tatcattacg ggaccagtaa agaactgatt 840  
 tcttcaactc tttccgtaca gaataaggtt tacgatcagc gtcgtatcat gcaccgtaaa 900  
 gtaaagccca atccggtat gtttgcctca aatgctgtcg tgcggatacc tctttgtgcc 960  
 gagaatgctg atttatggat cgagaacagt catatcggac caaagtggaa gattgcttca 1020  
  
 cgacatatta ttaccgggt tccgaaaat gactggfcat tggctgtgcc tgccggagtg 1080  
 tgtgtagatg tggttccgat gggtgataag ggctttgttg cccgtccata cggctcggac 1140  
 gatgtttca aaggagattt gagagattcc aaaacaacc tgacgggtat tccttttgg 1200  
 gaatggatgt ccaaaccggt tttgtcatat acagatttga aaggacgtac ggacgattta 1260  
 caggcagttt ccgtattccc tatggttaat tctgtagaag agttgggatt ggtgttgagg 1320  
 tggatgttgt ccgaaccga actggaggaa gaaagaata tctggttacg ttccgaacat 1380  
 ttttctgagg acgaaatttc ggcaggtgcc aatctgaagc gtttgtatgc acaacgtgaa 1440  
  
 gagttcagaa aaggaaactg gaaagcattg gccgttaatc atgaaaaag tgtttttat 1500  
 caacttgatt tggccgatgc agctgaagat tttgtacgtc ttggtttgga tatgcctgaa 1560  
 ttattgcctg aggatgctct gcagatgtca cgcattcata accggatgtt gcgtgcgcgt 1620  
 attttgaat tagacgggaa agattatcgt ccggaagaac aggctgcttt tgatttgctt 1680  
 cgtgacggct tgctggacgg gatcagtaat cgtaagagta ccccaaaatt ggatgtatat 1740  
 tccgatcaga ttgtttgggg acgtagcccc gtgcgcatcg atatggcagg tggatggacc 1800

gatactcctc cttattcact ttattcggga ggaaatgtgg tgaatctagc cattgagttg 1860

aacggacaac ctcccttaca ggtctatgtg aagccgtgta aagacttcca tatcgtcctg 1920

cgttctatcg atatgggtgc tatggaaata gtatctacgt ttgatgaatt gcaagattat 1980

aagaagatcg gttcaccttt ctctattccg aaagccgctc tgtcattggc aggctttgca 2040

cctgcgtttt ctgctgtatc ttatgcttca ttagaggaac agcttaaaga tttcggtgca 2100

ggtattgaag tgactttatt ggctgctatt cctgccggtt ccggtttggg caccagttec 2160

attctggctt ctaccgtact tggtgccatt aacgatttct gtggtttagc ctgggataaa 2220

aatgagattt gtcaacgtac tcttgttctt gaacaattgc tgactaccgg aggtggatgg 2280

caggatcagt atggagggtg gttgcagggt gtgaagcttc ttcagaccga ggccggcttt 2340

gctcaaagtc cattggtgcg ttggtaccg gatcatttat ttacgcatcc tgaatacaaa 2400

gactgtcact tgcctttatta taccgtata actcgtacgg caaaagggat ctggcagaa 2460

atagtcaagt ccatgttctt caattcatcg ttgcatctca atttacttcc ggaaatgaag 2520

gcgcatgcat tggatatgaa tgaagctata cagcgtggaa gttttgttga gtttgccgt 2580

ttggtaggaa aaacctggga acaaaaacaaa gcattggata gcggaacaaa tectccgct 2640

gtggaggcaa ttatcgatct gataaaagat tataccttgg gatataaatt gccgggagcc 2700

ggtggtggcg ggtacttata tatggtagcg aaagatccgc aagctgctgt tcgtattcgt 2760

aagatactga cagaaaacgc tccgaatccg cgggcacgtt ttgtcgaat gacgttatct 2820

gataagggat tccaagtatc acgatcataa 2850

<210> 2

<211> 903

<212> DNA

<213> H. pylori26695 ATCC700392

<400> 2

atggctttta aggtggtgca aatttcgga ggcttggga atcaaatgtt tcaatacgt 60

ttcgctaaaa gtttgcaaaa acactctaatacgcctgtgc tggtagatat cacttctttt 120

gattggagcg ataggaaaat gcaattagaa cttttcccta ttgatttggc ctatgcgagc 180

gcgaaagaaa tcgctatagc taaaatgcaa cacctcccga agctagtaag agacgcgctc 240

aaatgcatgg gatttgatag ggtgagtcaa gaaatcgttt ttgaatacga gcctaaattg 300

ctaaagccaa gccgcttgac ttattttttt ggctatttcc aagatccacg atactttgat 360

gctatatccc cttaaatcaa gcaaaccttc actctacccc cccccccga aaataataag 420

aataataata aaaaagagga agaatatcag tgcaagcttt ctttgatttt agccgctaaa 480

aacacgcgtgt ttgtgcatat aagaagaggg gattatgtgg ggattggctg tcagcttggg 540  
attgactatc aaaaaagcg gcttgagtat atggcaaagc gcgtgccaaa catggagctt 600  
  
tttgtgtttt gcgaagactt agaattcacg caaaatcttg atcttggcta cccctttatg 660  
gacatgacca ctagggataa agaagaagag gcgtattggg acatgctgct catgcaatct 720  
tgtcagcatg gcattatcgc taatagcact tatagctggg gggcggccta tttgatagaa 780  
aatccagaaa aatcattat tggccccaaa cactggcttt ttgggcatga gaatcctt 840  
tgaaggagt gggtgaaaat agaatcccat tttgaggtaa aatccccaaa gtataacgct 900  
taa 903  
<210> 3  
<211> 1365  
<212> DNA  
  
<213> H. pylori NCTC11637 ATCC43504  
<400> 3  
atgttccaac cctattaga cgcctttata gaaagcgtt ccattgaaaa aatggcctct 60  
aatctcccc cccccataa aatcgtgtg gcgaattggg ggggagatga agaaataaa 120  
gaatttaaaa agagcactct gtatttcatt ttaagtcagc attacacaat cactttacac 180  
cgaaaccctg ataaacctgc ggacatcgtt tttggtaacc cccttggatc agccagaaaa 240  
atcttatcct atcaaaacac taaacgaata ttttacaccg gtgaaaacga atcgcctaata 300  
ttcaacctct ttgattacgc catagccttt gatgaattag actttagaga tcgttatttg 360  
  
agaatgcctt tatattatga taggctacac cataaagccg agagcgtgaa tgacaccacc 420  
gcacctaca agattaaagg caacagcctt tatactttaa aaaaaccctc ccattgtttt 480  
aaagaaaacc acctaatit gtgcgcgctc atcaataatg agagcgtatcc tttgaaaaga 540  
gggtttgcca gttttgtagc gagcaacgct aacgctccta tgaggaacgc tttctatgac 600  
gctttaaatt ctattgagcc agttactggg ggaggagccg tgaaaaacac tttagcctat 660  
aaggttggaa acaaaagcga gtttttaagc caatacaaat tcaacctgtg ttttgaaac 720  
tcacaaggct atggctatgt aaccgaaaaa atcattgacg cttactttag ccatactatt 780  
  
cccatttatt gggggagtcc cagcgtggcg aaagatttta accctaagag ttttgtgaat 840  
gtccatgatt tcaacaactt tgatgaagcg attgattacg tgagatactt gcacacgcac 900  
ccaaacgctt atttagacat gctctatgaa aaccctttaa acacccttga tgggaaagct 960  
tacttttacc aaaatttgag ttttaaaaaa atcctagatt tttttaaac gatttttagaa 1020  
aacgacacga tttatcataa taacctttc attttctatc gtgattttaa tgagccgtta 1080

gtatccattg ataatttgag aatcaattat gataatttga gggttaatta tgatgatttg 1140  
 agggtaatt atgatgattt gagggttaat tatgatgatt tgagaatcaa ttatgatgat 1200  
  
 ttgagaatca attatgatga tttgagaatt aattatgagc gccttttgca aaacgcttca 1260  
 cctttattgg aattgtccca aaacacctct tttaaaatct atcgcaaaat ttatcaaaaa 1320  
 tccttaccct tattgcgtgt aataaggagg tgggttaaaa aataa 1365  
 <210> 4  
 <211> 1278  
 <212> DNA  
 <213> H. pylori26695 ATCC700392  
 <400> 4  
 atgttccaac ccctattaga cgcttttata gaaagcgctt ccattgaaaa aatggcctct 60  
 aaatctcccc cccccccct aaaaatcgct gtggcgaatt ggtggggaga tgaagaaatt 120  
 aaagaattta aaaagagcgt tctttatttt atcctaagcc aacgctacgc aatcacctc 180  
  
 caccaaaacc ccaatgaatt ttcagatcta gtttttagca atcctcttgg agcggetaga 240  
 aagattttat cttatcaaaa cactaaacga gtgttttaca ccggtgaaaa cgaatcacct 300  
 aatttcaacc tctttgatta cgccataggc tttgatgaat tggattttaa tgatcgttat 360  
 ttgagaatgc ctttgtatta tgcccatttg cactataaag ccgagcttgt taatgacacc 420  
 actgcgccct acaaactcaa agacaacagc ctttatgctt taaaaaaacc ctctcatcat 480  
 tttaaagaaa accaccctaa tttgtgcgca gtagtgaatg atgagagcga tcttttaaaa 540  
 agagggtttg ccagttttgt agcgagcaac gctaacgctc ctatgaggaa cgctttttat 600  
  
 gacgctctaa attccataga gccagttact gggggaggaa gtgtgagaaa cacttttaggc 660  
 tataaggttg gaaacaaaag cgagttttta agccaataca agttcaatct ctgttttgaa 720  
 aactcgcaag gttatggcta tgtaaccgaa aaaatccttg atgcgtatth tagccatacc 780  
 attcctatth attgggggag tcccagcgtg gcgaaaagatt ttaaccctaa aagttttgtg 840  
 aatgtgcatg atttcaaca ctttgatgaa gcgattgatt atatcaaata cctgcacacg 900  
 cacccaaacg cttattttaga catgctctat gaaaaccctt taaacacct tgatgggaaa 960  
 gcttactttt accaagattt gagtttttaa aaaatcctag atttttttaa aacgatttta 1020  
  
 gaaaacgata cgattttatca caaattctca acatctttca tgtgggagta cgatctgcat 1080  
 aagccgtag tatccattga tgatttgagg gtttaattatg atgatttgag ggttaattat 1140  
 gaccggctth tacaaaaacg ttcgccttta ttagaactct ctcaaaaacac cactttttaa 1200  
 atctatcgca aagcttatca aaaatccttg cctttgttgc gcgcggtgag aaagtgggtt 1260



aaaaaattgg gtttgtaa 1278  
 <210> 5  
 <211> 6169  
 <212> DNA  
 <213> E. coli K-12 ATCC10798  
 <400> 5  
 gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gaggatgccg gtgtctctta tcagaccgtt 60  
  
 tcccgcgtgg tgaaccaggc cagccacgtt tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtgggaagcg 120  
 gcgatggcgg agctgaatta cattccaac cgcgtggcac aacaactggc gggcaaacag 180  
 tcgttctga ttggcgttgc cacctccagt ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgtc 240  
 gcggcgatta aatctcgcgc cgatcaactg ggtgccagcg tgggtgtgtc gatggtagaa 300  
 cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt 360  
 gggctgatca ttaactatcc gctggatgac caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc 420  
 actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc tctgaccaga caccatcaa cagtattatt 480  
  
 ttctcccatg aagacggtag cgcactgggc gtggagcatc tggctgcatt gggtcaccag 540  
 caaatcgcgc tgtagcggg cccattaagt tctgtctcgg cgcgtctgcg tctggctggc 600  
 tggcataaat atctcactcg caatcaaat cagccgatag cggaacggga aggcgactgg 660  
 agtgccatgt ccggttttca acaaacatg caaatgtga atgagggcat cgttcccact 720  
 gcgatgctgg ttccaacga tcagatggcg ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtec 780  
 gggctgcgcg ttggtgcgga tatctcggta gtgggatacg acgataccga agacagctca 840  
 tgttatatcc cgcggttaac caccatcaa caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc 900  
  
 gtggaccgct tgetgcaact ctctcagggc caggcgtga agggcaatca getgttccc 960  
 gtctcactgg tgaagaaaa aaccacctg gcgccaata cgaaaccgc ctctccccgc 1020  
 gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacagttt cccgactgga aagcgggcag 1080  
 tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt 1140  
 tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc acacaggaaa 1200  
 cagctatgac catgattacg gattcactgg ccgtcgtggc ccgcaccgat cgccttccc 1260  
 aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc gctttgctg gtttccggca ccagaagcgg 1320  
  
 tgccgaaaag ctggctggag tgcgatcttc ctgagccga tactgtctc gtcccctcaa 1380  
 actggcagat gcacggttac gatgcgcca tctacaccaa cgtgacctat cccattacgg 1440  
 tcaatccgcc gtttgttccc acggagaatc cgacgggttg ttactcgtc acatttaatg 1500

ttgatgaaag ctggctacag gaaggccaga cgcaattat tttgatggc gttactcgg 1560  
 cgtttcatct gtggtgcaac gggcgtggg tcggttacgg ccaggacagt cgtttgccgt 1620  
 ctgaatttga cctgagcgca tttttacgg cgggagaaaa ccgcctcgcg gtgatggcgc 1680  
 tgcgctggag tgacggcagt tatctggaag atcaggatat gtggcggatg agcggcattt 1740  
  
 tccgtgacgt ctggttgcg cataaacga ctacacaaat cagcgatttc catgttgcca 1800  
 ctcgctttaa tgatgatttc agccgcgctg tactggagge tgaagttag atgtgcggcg 1860  
 agttgcgtga ctacctacgg gtaacagttt ctttatggca gggtagaacg caggctgcca 1920  
 gcggcaccgc gcctttcggc ggtgaaatta tcgatgagcg tgggtggttat gccgatcgcg 1980  
 tcacactacg tctgaacgtc gaaaaccga aactgtggag cgccgaaatc ccgaatctct 2040  
 atcgtgcggt ggttgaactg cacaccgccc acggcacgct gattgaagca gaagcctcgc 2100  
 atgtcggttt ccgcgaggtg cggattgaaa atggtctgct gctgctgaac ggcaagccgt 2160  
  
 tgctgattcg aggcgttaac cgtcacgagc atcatcctct gcatggcag gtcattgatg 2220  
 agcagacgat ggtgcaggat atcctgctga tgaagcagaa caactttaac gccgtgcgct 2280  
 gttgcatta tccgaacct ccgctgtggt acacgctgtg cgaccgctac ggctgtatg 2340  
 tggtagatga agccaatatt gaaaccacg gcatgggcc aatgaatcgt ctgaccgatg 2400  
 atccgcgctg gctaccggcg atgagcgaac gcgtaacgcg aatggtgcag cgcgatcgt 2460  
 atcaccggag tigtatcctc tggctcgtgg ggaatgaatc agccacggc gctaatcacg 2520  
 acgcgctgta tcgctggatc aaatctgtcg atccttccc cccggtgcag tatgaaggcg 2580  
  
 gcggagccga caccacggcc accgatatta tttgcccgat gtacgcgcgc tggatgaag 2640  
 accagccctt cccggctgtg ccgaaatggt ccatcaaaa atggctttcg ctacctggag 2700  
 agacgcgccc gctgatcctt tgcgaatag cccacgcgat gggtaacagt cttggcggtt 2760  
 tcgctaaata ctggcagggc tttcgtcagt atccccgtt acagggcggc ttcgtctggg 2820  
 actgggtgga tcagtgcctg attaaatag atgaaaacgg caaccctgg tcggcttacg 2880  
 gcggtgattt tggcgatag ccgaacgac gccagttctg tatgaacggt ctggtctttg 2940  
 ccgaccgcac gccgatcca gcgctgacgg aagcaaaaca ccagcagcag tttttccagt 3000  
  
 tccgtttatc cgggcaaacc atcgaagtga ccagcgaata cctgttccgt catagcgata 3060  
 acgagctcct gcaactggat gtggcgctgg atgtaagcc gctggcaagc ggtgaagtgc 3120  
 ctctggatgt cgctccaca ggtaaacagt tgattgaact gcctgaacta ccgacggcg 3180  
 agagcggcg gcaactcgg ctacacgtac gcgtagtga accgaacgcg accgcatggt 3240  
 cagaagccgg gcaatcagc gcctggcagc agtggcgtct ggcgaaaaac ctcagtgtga 3300  
 cgctccccgc cgcgtcccac gccatcccgc atctgaccac cagcgaatg gatTTTTGCA 3360

tcgagctggg taataagcgt tggcaattta accgccagtc aggctttctt tcacagatgt 3420

ggattggcga taaaaaaca ctgctgacgc cgctgcgcga tcagttcacc cgtgcaccgc 3480

tggataacga cattggcgta agtgaagcga cccgattga ccctaacgcc tgggtcgaac 3540

gctggaaggc ggcgggcat taccaggccg aagcagcgtt gttgcagtgc acggcagata 3600

catttctga tgcggtgctg attacgaccg ctcacgcgtg gcagcatcag gggaaaacct 3660

tatttatcag cgggaaaacc taccggattg atggtagtgg tcaaatggcg attaccgttg 3720

atgttgaagt ggcgagcgat acaccgcac cggcgcggat tggcctgaac tgccagctgg 3780

cgcaggtagc agagcgggta aactggctcg gattagggcc gcaagaaaac tatcccgacc 3840

gccttactgc cgctgtttt gaccgctggg atctgccatt gtcagacatg tatacccctg 3900

acgtcttccc gagcgaaaac ggtctgcgct gcgggacgcg cgaattgaat tatggccac 3960

accagtggcg cgcgacttc cagttcaaca tcagccgcta cagtcaacag caactgatgg 4020

aaaccagcca tcgcatctg ctgcacgcgg aagaaggcac atggctgaat atcgacggtt 4080

tccatatggg gattggtggc gacgactcct ggagcccgtc agtatcggcg gaattccagc 4140

tgagcggcgg tcgtaccat taccagttgg tctggtgtca aaaataataa taaccgggca 4200

ggccatgtct gcccgatatt cgcgtaagga aatccattat gtactattta aaaaacaaa 4260

acttttggat gttcggttta ttcttttct tttactttt tatcatggga gcctacttcc 4320

cgtttttccc gatttgcta catgacatca accatatcag caaaagtgat acgggiatta 4380

tttttgcgc tatttctctg ttctcgtat tattccaacc gctgtttggt ctgctttctg 4440

acaaactcgg gctgcgcaa tacctgctgt ggattattac cggcatgtta gtgatgtttg 4500

cgccgttctt tatttttacc ttccggccac tgttacaata caacatttta gtaggatcga 4560

ttgttggtgg tatttatcta ggcttttgtt ttaacgccgg tgcgccagca gtagaggcat 4620

ttattgagaa agtcagccgt cgcagtaatt tcgaatttgg tgcgcgcgg atgtttgct 4680

gtgttggctg ggcgctgtgt gcctcgattg tcggcatcat gttcaccatc aataatcagt 4740

ttgttttctg gctgggctct ggctgtgcac tcacctcgc cgttttactc tttttcgcca 4800

aaacggatgc gcctcttct gccacggttg ccaatgcggt aggtgccaac cattcgcat 4860

ttagccttaa gctggcactg gaactgtca gacagccaaa actgtggttt ttgtcactgt 4920

atgttattgg cgtttctgc acctacgatg tttttgacca acagtttget aatttcttta 4980

cttcgttctt tgctaccggt gaacagggta cgcgggtatt tggctacgta acgacaatgg 5040

gcgaattact taacgcctcg attatgttct ttgcgccact gatcattaat cgcacggtg 5100

ggaaaaacgc cctgctgctg gctggcacta ttatgtctgt acgtattatt ggctcatcgt 5160  
 tcgccacctc agcgcctggaa gtggttattc tgaaacgct gcatatgttt gaagtaccgt 5220  
 tcctgctggt gggctgcttt aaatatatta ccagccagtt tgaagtgcgt ttttcagcga 5280  
 cgattttatct ggictgtttc tgcttcttta agcaactggc gatgatTTTT atgtctgtac 5340  
 tggcgggcaa tatgtatgaa agcatcgggt tccagggcgc ttatctgggt ctgggtctgg 5400  
 tggcgcctggg cttcacetta atttccgtgt tcacgcttag cggccccggc ccgctttccc 5460  
 tgctgcgtcg tcaggtgaat gaagtcgctt aagcaatcaa tgtcggatgc ggcgcgagcg 5520

ccttatccga ccaacatata ataacggagt gatcgcatg aacatgcaa tgaccgaaag 5580  
 aataagagca ggcaagctat ttaccgatat gtgcgaaggc ttaccgaaa aaagacttctg 5640  
 tgggaaaacg ttaatgtatg agtttaatca ctgcaccca tcagaagtgt aaaaaagaga 5700  
 aagcctgatt aaagaaatgt ttgccacggt aggggaaaaac gcctgggtag aaccgcctgt 5760  
 ctattttctt tacggttcca acatccatat aggccgcaat ttttatgcaa atttcaattt 5820  
 aaccattgtc gatgactaca cggtacaat cggtgataac gtactgattg cacccaacgt 5880  
 tactctttcc gttacgggac accctgtaca ccatgaattg agaaaaaac gcgagatgta 5940

ctcttttccg ataacgattg gcaataacgt ctggatcgga agtcatgtgg ttattaatcc 6000  
 aggcgtcacc atcggggata attctgttat tggcgcgggt agtatcgtca caaaagacat 6060  
 tccaccaaac gtcgtggcgg ctggcgcttc ttgtcgggtt attcgcgaaa taaacgaccg 6120  
 ggataagcac tattatttca aagattataa agttgaatcg tcagtttaa 6169

- <210> 6
- <211> 3137
- <212> DNA
- <213> E. coli K-12 ATCC10798
- <400> 6

gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg gtgtctctta tcagaccgtt 60  
 tcccgcgtgg tgaaccaggc cagccacgtt tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtgggaagcg 120  
  
 gcgatggcgg agctgaatta cattccaac cgcgtggcac aacaactggc gggcaaacag 180  
 tcgttgctga ttggcgttgc cacctccagt ctggccctgc acgcgccgtc gcaaattgtc 240  
 gcggcgatta aaictcgcgc cgatcaactg ggtgccagcg tgggtggtgc gatggtagaa 300  
 cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt 360  
 gggctgatca ttaactatcc gctggatgac caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc 420  
 actaatgttc cggcgttatt tcttgatgic tctgaccaga cacccatcaa cagtattatt 480

ttctccatg aagacggtag gcgactgggc gtggagcatc tggctgcatt gggtcaccag 540  
  
 caaatcgcg tgttagcggg cccattaagt tctgtctcgg cgcgtctgcg tctggctggc 600  
 tggcataaat atctcactcg caatcaaatt cagccgatag cggaacggga aggcgactgg 660  
 agtgccatgt ccggttttca acaaaccatg caaatgtga atgagggcat cgttcccact 720  
 gcgatgctgg ttgccaacga tcagatggcg ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtcc 780  
 gggctgcgcg ttggtgcgga tatctcggta gtgggatcag acgataccga agacagctca 840  
 tgttatatcc cgcggttaac caccatcaa caggattttc gcctgctggg gcaaaccagc 900  
 gtggaccgct tgctgcaact ctctcagggc caggcggatga agggcaatca gctgttgccc 960  
  
 gtctcactgg tgaagaaaa aaccacccctg gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc 1020  
 gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag 1080  
 tgagcgcaac gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt 1140  
 tatgcttccg gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa 1200  
 tccattatgt actatntaaa aaacacaaac ttttggatgt tcggtttatt ctttttcttt 1260  
 tactttttta teatgggagc ctacttcccg tttttccga tttggctaca tgacatcaac 1320  
 catatcagca aaagtgatac gggatattat tttgccgcta tttctctgtt ctcgctatta 1380  
  
 ttccaaccgc tgtttggtct gctttctgac aaactcgggc tgcgcaaata cctgctgtgg 1440  
 attattaccg gcatgttagt gatgtttgcg ccgttcttta tttttatctt cgggccactg 1500  
 ttacaataca acatttttagt aggatcgatt gttgggtgta tttatctagg cttttgtttt 1560  
 aacgcgggtg cgcagcagct agaggcattt attgagaaag tcagccgtcg cagtaatttc 1620  
 gaatttggtc gcgcgcggat gtttggctgt gttggctggg cgctgtgtgc ctcgattgtc 1680  
 ggcatcatgt tcaccatcaa taatcagttt gttttctggc tgggctctgg ctgtgcactc 1740  
 atctctgccc ttttactctt tttcgccaaa acggatgcgc cctcttctgc cacggttgc 1800  
  
 aatgcggtag gtgccaacca ttcggcattt agccttaagc tggcactgga actgttcaga 1860  
 cagccaaaac tgtggttttt gtcactgtat gtatttggcg tttctctcac ctacgatgtt 1920  
 tttgaccaac agtttgctaa tttctttact tcgttctttg ctaccggtga acagggtacg 1980  
 cgggtatttg gctacgtaac gacaatgggc gaattactta acgcctcgat tatgttcttt 2040  
 gcgccactga tcattaatcg catcggtggg aaaaacgccc tgctgctggc tggcactatt 2100  
 atgtctgtac gtattattgg ctcatcgctt gccacctcag cgctggaagt ggttattctg 2160  
 aaaacgctgc atatgtttga agtaccgttc ctgctggtgg gctgctttaa atattacc 2220

agccagtttg aagtgcgttt ttcagcgacg atttatctgg tctgtttctg cttctttaag	2280
caactggcga tgatTTTTat gtctgtactg gcgggcaata tgtatgaaag catcggtttc	2340
cagggcgctt atctgggtgt gggctctgggtg gcgctgggct tcaccttaat ttccgtgttc	2400
acgcttagcg gccccggccc gctttccctg ctgctcgtc aggigaatga agtcgcttaa	2460
gcaatcaatg tcggatcggc cgcgagcgcc ttatccgacc aacatcatcat aacggagtga	2520
tcgcatgaa catgccaatg accgaaagaa taagagcagg caagctatTT accgatatgt	2580
gcgaaggctt accggaaaaa agacttcgtg ggaaaacgtt aatgtatgag tttaatcact	2640
cgcattccatc agaagttgaa aaaagagaaa gcctgattaa agaaatgttt gccacggtag	2700
gggaaaacgc ctgggtagaa ccgctgtctt atttctctta cggttccaac atccatatag	2760
gccgcaattt ttatgcaaat ttcaatttaa ccattgtcga tgactacacg gtaacaatcg	2820
gtgataacgt actgattgca cccaacgtta ctctttccgt tacgggacac cctgtacacc	2880
atgaattgag aaaaaacggc gagatgtact cttttccgat aacgattggc aataacgtct	2940
ggatcgggaag tcatgtggtt attaatccag gcgtcacat cggggataat tctgttattg	3000
gcgcgggtag tatcgtcaca aaagacattc caccaaactc cgtggcggct ggcgttcctt	3060
gtcgggttat tcgcgaaata aacgaccggg ataagcacta ttatttcaa gattataaag	3120
ttgaatcgtc agtttaa	3137