



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월08일
(11) 등록번호 10-1794971
(24) 등록일자 2017년11월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/72 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/72 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0012803
- (22) 출원일자 2016년02월02일
심사청구일자 2016년02월02일
- (65) 공개번호 10-2017-0092159
- (43) 공개일자 2017년08월11일
- (56) 선행기술조사문헌
WO2012049083 A2*
KR101544184 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
서울대학교 산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
- (72) 발명자
서진호
서울특별시 서초구 방배로 239 방배동 뽕피스 현대 APT 101-903호 (방배동)
정상민
충청남도 당진시 당진중앙2로 212-10 신성아파트 2동 710호
진영욱
서울특별시 관악구 남부순환로220길 38 1104호 (봉천동, 성경오피스텔)
- (74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 8 항

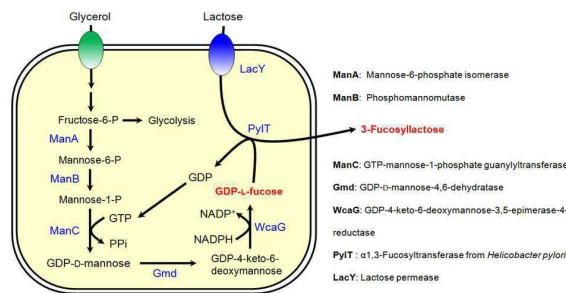
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 α -1,3-푸코실락토오스의 대량 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 재조합 대장균을 이용한 α -1,3-푸코실락토오스의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명의 재조합 대장균을 이용할 경우, 생산수율이 낮아 산업적 측면 대량 생산이 불가능하였던 종래기술의 제약을 극복하여, 매우 높은 생산수율로 3-푸코실락토오스를 대량 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 9/0006 (2013.01)

C12N 9/1051 (2013.01)

C12N 9/1241 (2013.01)

C12N 9/88 (2013.01)

C12P 19/12 (2013.01)

C12N 2511/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0652-20150015

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 차세대바이오매스연구단

연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업

연구과제명 미세조류 유래 통합 당류 이용 스마트생물소재 생산기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

α -1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균에 있어서,

상기 재조합 대장균은,

헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 26695에서 유래한 것으로, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 α -1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 핵산서열이 도입되어 있고,

GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (Gmd), GDP-L-푸코오스 신타아제 (WcaG), 포스포만노뉴타아제 (ManB), 그리고 만노오스-1-포스페이트 구아닐트랜스퍼라아제 (ManC)를 암호화하는 유전자가 도입되어 있으며,

wcaJ (UDP-glucose lipid carrier transferase) 유전자가 제거된 것을 특징으로 하는 α -1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 α -1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 핵산서열은, 서열번호 1에 기재된 핵산서열인 것을 특징으로 하는 α -1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 대장균은,

대장균(*E. coli*) BL 21 star(DE3) 균주인 것을 특징으로 하는 α -1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 재조합 대장균은,

'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 것을 특징으로 하는 α -1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

글리세롤 및 락토오스가 함유된 배지에 제1항의 제조합 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 α -1,3-푸코실락토오스의 생산방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 α -1,3-푸코실락토오스의 생산방법은,

글리세롤을 추가로 공급하는 유가식 배양인 것을 특징으로 하는 α -1,3-푸코실락토오스의 생산방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 유가식 배양은,

37℃의 배양온도로 배양을 시작하다가,

헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 26695에서 유래한 것으로 α -1,3-푸코오즈전이효소를 암호화하는 서열번호 1의 유전자 *fucB*를 발현시킨 후, 배양온도를 25℃ 낮추는 것을 특징으로 하는 α -1,3-푸코실락토오스의 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 α -1,3-푸코실락토오스의 생산방법은,

배양온도를 25℃로 낮춘 후, 락토오스를 배양배지 중에 주입하는 것을 특징으로 하는 α -1,3-푸코실락토오스의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 α -1,3-푸코실락토오스의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 제조합 대장균을 이용한 α -1,3-푸코실락토오스의 대량 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인간의 모유에는 200여 종 이상의 각기 다른 구조를 가지는 올리고당 (Human Milk Oligosaccharide, HMO)이 다 른 포유류에 비해 상당히 높은 농도 (5~15 g/L)로 존재한다.

[0004] HMO는 프리바이오틱(prebiotic) 효과, 병원균 장내부착 억제 효과 그리고 면역조절시스템 조절효과 등 영유아에 게 필수적인 기능성을 발휘하는 것으로 알려져 있어 최근 각광을 받고 있다.

[0005] HMO 중에 가장 많은 양으로 존재하는 2-푸코실락토오스는 앞서 언급한 다양한 생물학적 활성에 관여하는 주요 HMO인 것으로 보고되어 있는데, 이의 이성질체인 3-푸코실락토오즈 또한 위와 같은 기능성을 지닐 것으로 기대 되고 있다.

[0006] HMO 중 2-푸코실락토오즈는 약 33% 정도 존재하는 반면, 3-푸코실락토오즈는 3~4% 정도로 소량 존재하는 것으로 알려져 있는데, 3-푸코실락토오즈의 생산방법은 직접 모유로부터 추출하는 방법과 화학적 또는 효소적 방법으로 추출하는 방법이 있다.

[0007] 직접 추출하는 방법은 모유 공급의 한계와 낮은 생산성이 문제이다. 화학적 합성법은 고가의 기질, 낮은 이성체 선택성과 생산수율, 그리고 독성시약의 사용 등의 문제가 있다. 또한, 효율적 합성법은 전구체가 되는 GDP-L-푸코오스가 매우 고가라는 점과 푸코오스전이효소의 정제비용이 많이 든다는 문제점이 있다.

[0008] 상기와 같은 문제점으로 인해 3-푸코실락토오스는 대량생산이 어렵고 대량 생산을 위한 기술이 거의 없는 실정이다. 하지만, 유아용 이유식에 첨가됨으로써 많은 기능성 향상을 기대할 수 있기 때문에, 산업적 생산을 위한 더욱 많은 연구가 필요하다 할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록번호 제10-1544184호 (등록일자 2015. 08. 06)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 이용한 2-푸코실락토오스의 제조방법이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명에서는 재조합 대장균을 이용하여, α-1,3-푸코실락토오스를 대량으로 생산할 수 있는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은, α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균에 있어서, 상기 재조합 대장균은, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 26695에서 유래한 것으로, 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 α-1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 핵산서열이 도입되거나, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 43504 에서 유래한 것으로, 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 α-1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 핵산서열이 도입되어 있는 것을 특징으로 하는 α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균을 제공한다.

[0014] α-1,3-푸코실락토오스를 생산하기 위해서는, GDP-L-푸코오스(GDP-L-fucose)와 락토오스(lactose)를 기질로 하여 α-1,3-푸코실락토오스 생산 반응을 수행하는 α-1,3-푸코오스전이효소(α-1,3-fucosyltransferase)가 필요하다 (도 1 참조 요망). 이 효소는 다양한 미생물에 존재하는데, 본 발명에서는 α-1,3-푸코실락토오스의 생산수율이 우수한 α-1,3-푸코오스전이효소 2종 (FucB, PyIT)을 발굴한 것이다.

[0015] 하기 본 발명의 실험에 의할 경우, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 26695 유래 α-1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 서열번호 1의 유전자 *fucB*를 본 발명에 도입할 경우, 유가식 배양에서 0.42 g 3-FL/g lactose의 α-1,3-푸코실락토오스 생산수율을 확인할 수 있었고, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 43504 유래 α-1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 서열번호 2의 유전자 *pyIT*를 본 발명에 도입할 경우, 유가식 배양에서 0.57 3-FL/g lactose의 α-1,3-푸코실락토오스 생산수율을 확인할 수 있었다. 이에 반하여, 박테로이데스 프라질리스 (*Bacteroides fragilis*) ATCC 25285 유래의 α-1,3-푸코오스전이효소들은 α-1,3-푸코실락토오스 생산수율이 각각 0.007 3-FL/g lactose, 0.009 3-FL/g lactose에 불과하였다.

[0016] 한편, 본 발명의 α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균에 있어서, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 α-1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 핵산서열은 바람직하게 서열번호 1에 기재된 핵산서열 (*fucB* 유전자)일 수 있다. 또한, 서열번호 6의 아미노산 서열을 갖는 α-1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 핵산서열은 바람직하게 서열번호 2에 기재된 핵산서열 (*pyIT* 유전자)일 수 있다.

[0017] 한편, 본 발명의 α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균에 있어서, 상기 대장균은 바람직하게 대장균 (*E. coli*) BL 21 star(DE3)균주인 것이 좋다. 기존에 사용된 대장균 (*E. coli*) K12는 F'플라즈미드를 가지고 있기 때문에 과량의 바이오필름을 생성하고, 높은 세포밀도에서 자라면서, 생산물 형성 비율을 증가시키기 위해 세포성장이 억제되는 문제가 발생한다. 또한, 높은 수준의 아세테이트를 축적하는 문제도 있어, 전체적으로 유가식 배

양 자체가 힘든 문제가 있다.

- [0018] 하지만, 본 발명의 대장균 (*E. coli*) BL21 star(DE3)는 F' 플라스미드를 가지지 않고, 활발한 당대사로 인해 세포성장도 빠르다. 또한, 아세테이트 축적량이 상대적으로 적고, 글루코스 이용률이 우수한 특징이 있다. 이와 같은 이유로 인해 대장균 (*E. coli*) BL21 star(DE3)는 본 발명의 α-1,3-푸코실락토오스 생산에 적합한 균주이고, 유가식 배양을 통해 대량의 α-1,3-푸코실락토오스를 생산할 수 있는 것이다.
- [0019] 한편, 본 발명의 α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균에 있어서, 상기 재조합 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.
- [0020] 상기 본 발명의 대장균 (*E. coli*) BL21 star(DE3) 균주는 상기에서 살펴본 여러 장점 때문에, α-1,3-푸코실락토오스의 생산을 위한 최적 균주라 할 수 있으나, 락토오스의 대사가 강하기 때문에, 고수율로 α-1,3-푸코실락토오스의 생산을 위해서는 *lacZ*의 과쇄가 필수적으로 필요하다.
- [0021] 이에 본 발명에서는 변형된 *lacZ* 및 야생형 *lacYA*를 보유한 ΔL M15 균주 및 *lacZ* 결실 및 야생형 *lacYA*를 보유한 ΔL YA 균주를 구축하였는데, 이들 균주는 락토오스의 대사를 억제하고, 락토오스의 대장균 내로 유입이 원활하도록 개발된 균주이다.
- [0022] 한편, 본 발명의 α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균에 있어서, 상기 재조합 대장균은, 바람직하게 GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (*Gmd*), GDP-L-푸코오스 신타아제 (*WcaG*), 포스포만노뮤타아제 (*ManB*), 그리고 만노오스-1-포스페이트 구아닐트랜스퍼라아제 (*ManC*)를 암호화하는 유전자가 도입되어 있는 것이 좋다.
- [0023] 이들 유전자가 균주 내로 도입됨으로써, 글리세롤로부터 GDP-L-푸코오스를 생산하는 생합성 경로가 강화되어, 궁극적으로 α-1,3-푸코실락토오스의 생산량을 늘릴 수 있다.
- [0024] 한편, 본 발명의 α-1,3-푸코실락토오스 생산용 재조합 대장균에 있어서, 상기 재조합 대장균은 *wcaJ* 유전자가 제거된 것이 좋다. 이 유전자가 제거됨으로써, α-1,3-푸코실락토오스의 전구체로 사용이 되어지는 GDP-L-푸코오스가 콜라닌산 (*colanic acid*)으로 전환되는 것을 막아 최종적인 생산 수율을 높이는 효과가 발휘된다.
- [0025] 한편, 본 발명은 글리세롤 및 락토오스가 함유된 배지에 상기 본 발명의 α-1,3-푸코실락토오스의 생산용 재조합 대장균을 배양하는 것을 특징으로 하는 α-1,3-푸코실락토오스의 생산방법을 제공한다. 이때, 상기 α-1,3-푸코실락토오스의 생산방법은, 바람직하게 글리세롤을 추가로 공급하는 유가식 배양인 것이 좋다.
- [0026] 또한, 본 발명의 상기 유가식 배양은, 바람직하게 37℃의 배양온도로 배양을 시작하다가, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 26695에서 유래한 것으로 α-1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 서열번호 1의 유전자 *fucB*를 발현시키거나, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 43504 에서 유래한 것으로 α-1,3-푸코오스전이효소를 암호화하는 서열번호 2의 유전자 *pylT*를 발현시킨 후, 배양온도를 25℃ 낮추는 것이 좋다.
- [0027] 또한, 바람직하게 배양온도를 25℃로 낮춘 후, 락토오스를 배양배지 중에 주입하는 것이 좋다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 재조합 대장균을 이용할 경우, 생산수율이 낮아 산업적 측면 대량 생산이 불가능하였던 종래기술의 제약을 극복하여, 매우 높은 생산수율로 α-1,3-푸코실락토오스를 대량 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 글리세롤 및 락토오스로부터 α-1,3-푸코실락토오스를 생합성하는 경로를 보여주는 모식도이다.
- 도 2는 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFucB 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pPy1T 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFra1 균주' 및 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFra2 균주'를 이용한 3-푸코실락토오스의 회분식 배양 결과이다.
- 도 3은 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFucB 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pPy1T 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra1 균주' 및 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra2 균주'를 이용한

유가식 배양 결과이다.

도 4는 'BL21 (DE3) star 균주'의 *wcaJ* 유전자 과채 결과이다.

도 5는 'BL21 (DE3) star ΔL YA Δ*wcaJ* pmBCGW + pPy1T 균주'의 유가식 배양 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0034] **[제조예 1: 재조합 균주 및 플라스미드 제작]**
- [0035] 본 발명자가 이미 구축한 GDP-푸코오즈 생산 균주 (*E. coli* BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW)에, 추가적으로 α-1,3-푸코오즈전이효소를 도입하여 새로운 3-푸코실락토오즈 생산 균주를 구축하고자 하였다.
- [0036] 한편, pmBCGW 벡터는 글리세롤 또는 글루코오즈를 푸코실락토오즈의 전구체로 사용되는 GDP-L-푸코오즈로 전환시키기 위하여 상기 대장균에 삽입된 것이다 (Lee, W. H., et al., 2009, Bioresour Technol, 100(24):6143). 이 벡터는 pETDuet-1에 Gmd (GDP-D-mannose-4, 6-dehydratase), WcaG (GDP-L-fucose synthase), ManB (phosphomannomutase), 그리고 ManC (mannose-1-phosphate guanyltransferase)의 네 가지 단백질을 발현시킬 수 있으며, 모든 유전자는 대장균에서 유래하였다.
- [0037] 한편, 실시예 2에서 사용한 호스트 균주인 *E. coli* BL21 (DE3) star ΔL M15는 하기의 방법으로 제작하였다. 우선 pGlaCZΔM15를 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. 증폭된 DNA 단편을 'In-Fusion HD Cloning Kit (TAKARA, Japan)'을 사용하여 각각 *Sma*I이 처리된 pGRG36에 삽입하였고, 그 결과 pGlaCZΔM15 (변형된 *lacZ* 및 야생형 *lacYA* 보유)를 구축할 수 있었다 (Chin, Y.W., et al. (2015) Journal of Biotechnology 210: 107-115). 이 pGlaCZΔM15를 *E. coli* BL21 (DE3) star에 삽입하여 최종적으로 *E. coli* BL21 (DE3) star ΔL M15를 제작할 수 있었다.
- [0038] 한편, 하기 실시예 3에서 사용한 호스트 균주인 *E. coli* BL21 (DE3) star ΔL YA 호스트 균주를 하기의 방법으로 제작하였다. pGlaCYA를 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 *Sma*I이 처리된 pGRG36에 삽입하였고, 그 결과, pGlaCYA (*lacZ* 결실 및 야생형 *lacYA* 보유)가 구축되었다 (Chin, Y.W., et al. (2015) Journal of Biotechnology 210: 107-115). 이 pGlaCYA를 *E. coli* BL21 (DE3) star에 삽입하여 최종적으로 *E. coli* BL21 (DE3) star ΔL YA를 제작할 수 있었다.
- [0039] 한편, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 26695에서 α-1,3-푸코오즈전이효소 유전자 *fucB* (서열번호 1)를 클로닝하여 pCOLADuet-1에 도입함으로써 재조합 벡터 pFucB를 구축하였다. 또한, 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 43504 에서 α-1,3-푸코오즈전이효소 유전자 *py1T* (서열번호 2)를 클로닝하여 pCOLADuet-1에 도입함으로써 재조합 벡터 pPy1T를 구축하였다. 또한, 박테로이데스 프라질리스 (*Bacteroides fragilis*) ATCC 25285 유래의 α-1,3-푸코오즈전이효소 유전자 *fra1* (서열번호 3), *fra2* (서열번호 4)를 pCOLADuet-1에 각각 도입함으로써 재조합 벡터 pFra1, pFra2를 각각 구축하였다.
- [0040] 한편, 실시예 2의 3-푸코실락토오즈 생산을 위하여 상기에서 구축한 벡터를 GDP-푸코오즈 생산 균주 (BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW)에 도입함으로써, 최종적으로 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFucB 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pPy1T 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFra1 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFra2 균주'를 각각 구축하였다.
- [0041] 또한, 실시예 3의 3-푸코실락토오즈 생산을 위하여 상기에서 구축한 벡터를 GDP-푸코오즈 생산 균주 (*E. coli* BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW)에 도입함으로써, 최종적으로 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFucB 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pPy1T 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra1 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra2 균주'를 각각 구축하였다.
- [0042] 한편, 3-푸코실락토오즈를 생산하기 위한 모든 균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오티드를 표 1내지 2에 기재하였다.

[0043]

균주 및 플라스미드

균주	관련된 특징
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>f80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
<i>E. coli</i> BL21star(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _B m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm rne131</i> (DE3)
ΔL	BL21star(DE3) Δ <i>lacZYA</i>
ΔL M15	BL21star(DE3) Δ <i>lacZYA Tn7::lacZΔM15YA</i>
ΔL YA	BL21star(DE3) Δ <i>lacZYA Tn7::lacYA</i>
플라스미드	관련된 특징
pmBCGW	pETDuet-1 + <i>gmd-wcaG</i> (<i>NdeI/XhoI</i>) + <i>manB-manC</i> (<i>NcoI+EcoRI</i>)
pCOLADuet-1	Two T7 promoters, ColA replicon, Kan ^R
pFucB	pCOLADuet-1 + <i>fucB</i> (<i>NdeI/KpnI</i>)
pPyIT	pCOLADuet-1 + <i>pyIT</i> (<i>NdeI/KpnI</i>)
pFra1	pCOLADuet-1 + <i>fra1</i> (<i>NdeI/KpnI</i>)
pFra2	pCOLADuet-1 + <i>fra2</i> (<i>NdeI/BglIII</i>)

표 2

[0045]

사용된 프라이머

프라이머 이름	서열(5'→3')	비고	
F_ <i>NdeI</i> - <i>fucB</i>	GGAATTCATATGTTCCAACCCCTATTAGACGC		
R_ <i>KpnI</i> - <i>fucB</i>	GGGTACCTTACAAACCAATTTTTTAACCAAC		
F_ <i>NdeI</i> - <i>pyIT</i>	GGAATTCATATGTTCCAACCCCTATTAGACGCC		
R_ <i>KpnI</i> - <i>pyIT</i>	GGGTACCTTATTTTTTAACCCACCTCCTATTACACG		
F_ <i>NdeI</i> - <i>fra1</i>	GGAATTCATATGATATATGATTCTTTTTTATAATACGATGTGG		
R_ <i>KpnI</i> - <i>fra1</i>	CGGGTACCTCATATCCCTCCCAATTTTAGTTCGTGTAT		
F_ <i>NdeI</i> - <i>fra2</i>	GAAGATCTATGAAAAAGTATTCATTCCTATAAATACCAAAATTCCTG		
R_ <i>BglIII</i> - <i>fra2</i>	CGGGTACCTAATAAAACAACCTGTATATTCTATTTCT		
* 이탤릭체로 표시된 서열은 특정 제한효소의 인지 부위를 나타냄			

[0047]

[실시예 1: 회분식 배양을 통한 α-1,3-푸코실락토오스 생산]

[0048]

상기 제조예 1에서 새로이 구축된 균주들을 이용하여 α-1,3-푸코실락토오스를 생산하였다. 플라스크를 이용하여 최소 배지(13.5 g/L KH₂PO₄, 4.0 g/L (NH₄)₂HPO₄, 1.7 g/L citric acid, 1.4 g/L MgSO₄·7H₂O, 10 ml/L 미량 원소용액 (10 g/L Fe(III) citrate, 2.25 g/L ZnSO₄·7H₂O, 1.0 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.35 g/L MnSO₄·H₂O, 0.23 g/L Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.11 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 2.0 g/L CaCl₂·2H₂O), pH6.8)에, 20 g/L의 글리세롤을 초기 탄소원으로 첨가하여 3-푸코실락토오스를 생산하였다. 그리고, OD₆₀₀가 0.6-0.8이 되었을 때 IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 0.1 mM 농도로 유도(induction)를 진행하였고, 이때 락토오스를 20 g/L가 되도록 배지에 첨가해주었다.

[0049]

실험 결과는 도 2와 같이 나타났다. 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFucB 균주'의 경우 0.13 g/L, 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pPyIT 균주'의 경우 0.24 g/L의 3-푸코실락토오스를 각각 생산하였다. 또한, 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFra1 균주'와 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFra2 균주'는 각각 0.16 g/L, 0.06 g/L의 α-1,3-푸코실락토오스를 생산하였다.

[0050]

도 2는 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFucB 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pPyIT 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFra1 균주' 및 'BL21 (DE3) star ΔL M15 pmBCGW + pFra2 균주'를 이용한 α-1,3-푸코실락토오스 생산 결과이다.

[0052]

[실시예 2: 유가식 배양을 통한 α-1,3-푸코실락토오스의 대량 생산]

[0053]

상기 제조예 1에서 제작한, 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFucB 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW

+ pPy1T 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra1 균주' 및 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra2 균주'를 가지고, α-1,3-푸코실락토오스의 대량 생산을 위한 유가식 배양을 실시하였다.

[0054] 2.5 L 바이옱리액터를 이용하여, 상기 실시예 1의 플라스크 배양과 같은 조성의 1 L 최소배지에서 고농도 세포 배양 및 3-푸코실락토오스 대량 생산을 위한 유가식 배양을 실시하였다.

[0055] 초기 20 g/L의 글리세롤을 이용하여 세포 건조균체량이 약 OD₆₀₀=6.5가 될 때까지, 키운 후 IPTG 0.1 mM 농도로 단백질을 발현시켰다. 이때, 발효기의 온도를 37°C에서 25°C로 조절하였고, 추가적으로 락토오스를 20 g/L 농도가 되도록 추가하였다. 또한, pH-stat을 이용하여 pH가 6.78~6.72가 되도록 유지하면서, 글리세롤을 계속적으로 공급하였다. 교반속도는 1200 rpm이었으며, 통기 속도는 2 vvm이 되도록 조절하였다.

[0056] 실험 결과, 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFucB 균주'의 경우 72시간 동안 16 g/L의 락토오스를 이용하여 6.7 g/L의 α-1,3-푸코실락토오스를 생산하였다. 그리고, 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pPy1T 균주'의 경우는 58시간 동안 20.2 g/L의 락토오스를 이용하여 10.6 g/L의 α-1,3-푸코실락토오스를 생산하였다. 또한, 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra1 균주'의 경우 48.5시간 동안 0.1 g/L의 α-1,3-푸코실락토오스를 생산하였다. 또한, 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra2 균주'의 경우 50.8시간 동안 0.14 g/L의 α-1,3-푸코실락토오스를 생산하였다.

[0057] 상기의 1 L 배양 결과 헬리코박터 파이로리 (*Helicobacter pylori*) ATCC 43504 유래의 py1T가 가장 높은 3-푸코실락토오스의 생산을 보였으며, 박테로이데스 프라질리스 (*Bacteroides fragilis*) ATCC 25285 유래의 α-1,3-푸코오스전이효소들은 α-1,3-푸코실락토오스를 거의 생산하지 못하는 것으로 나타났다.

[0058] 하기 표 3은 상기 실험의 결과를 정리한 것이고, 도 3은 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFucB 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pPy1T 균주', 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra1 균주' 및 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + pFra2 균주'를 이용한 유가식 배양 결과이다.

표 3

	Maximum dry cell mass (g/L)	Consumed lactose conc. (g/L)	Maximum 3-FL conc. (g/L)	Yield (g 3-FL / g lactose)	Productivity (g/L · h)
FucB	47.2	16.1	6.7	0.42	0.106
Py1T	52.1	20.2	10.6	0.57	0.203
Fra1	48.5	14.5	0.1	0.007	
Fra2	50.8	14.8	0.14	0.009	

[0061] [실시예 3: *wcaJ* 유전자의 추가적 파쇄]

[0062] *wcaJ* 유전자의 추가적 파쇄를 위하여 lambda red recombinase (One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, K.A. Datsenko, *PNAS*, 2000)를 이용하였다. 도 4는 'BL21 (DE3) star 균주'의 *wcaJ* 유전자 파쇄 결과이다 (1. 야생형 *wcaJ* 확인, 2. Kanamycin cassette 삽입, 3. Δ*wcaJ* 균주 확인). 도 4의 밴드에서 볼 수 있듯이, *wcaJ* 유전자가 잘 파쇄된 것을 확인할 수 있었다.

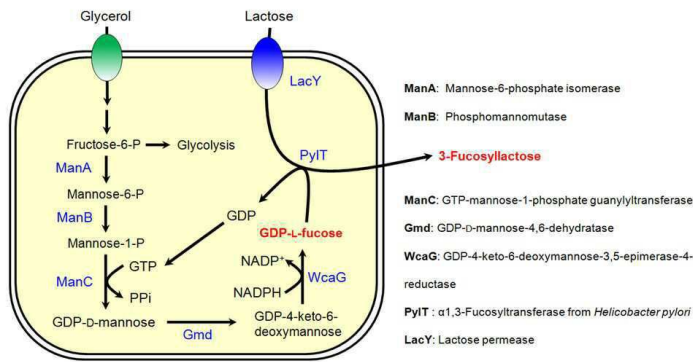
[0064] [실시예 4: *wcaJ* 파쇄 균주의 확인]

[0065] 상기 제조예 1에서 구축된 기존의 균주로부터 추가적으로 *wcaJ*가 파쇄된 'BL21 (DE3) star ΔL YA Δ*wcaJ* pmBCGW + Py1T 균주'를 구축하였다. 또한, 상기에 명시된 같은 방법의 발효 조건으로 유가식 배양을 실시하였다.

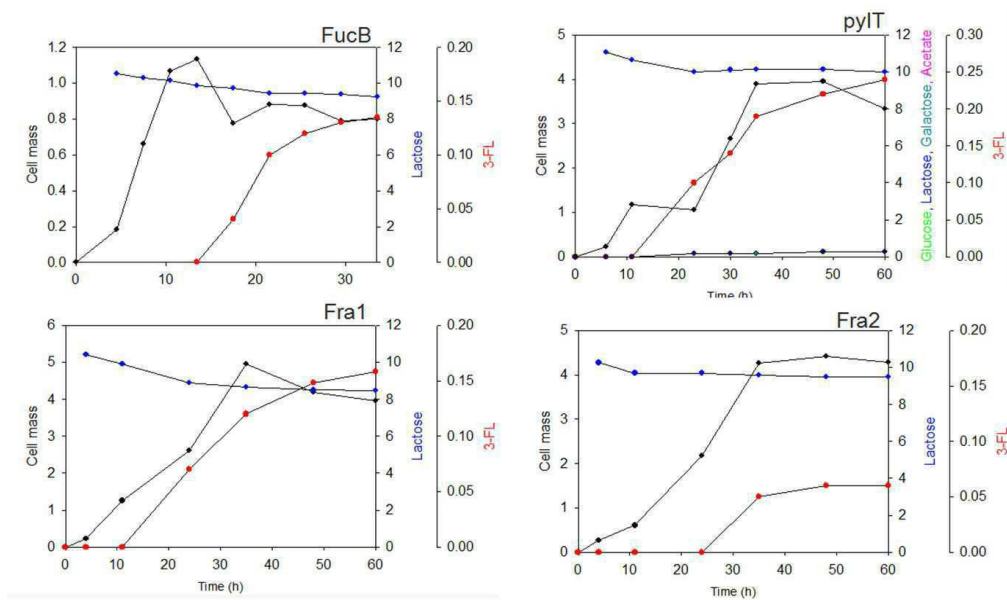
[0066] 총 발효시간 59시간이었으며, 18.2 g/L의 락토오스를 이용하여, 11.5 g/L의 3-푸코실락토오스를 생산할 수 있었다. *wcaJ* 파쇄 균주는 그렇지 않은 'BL21 (DE3) star ΔL YA pmBCGW + Py1T 균주'와 비교하여 적은 양의 락토오스를 이용하였음에도 불구하고 약 8.5 %의 생산량이 증가를 보였다. 도 5는 'BL21 (DE3) star ΔL YA Δ*wcaJ* pmBCGW + Py1T 균주'의 유가식 배양 결과이다.

도면

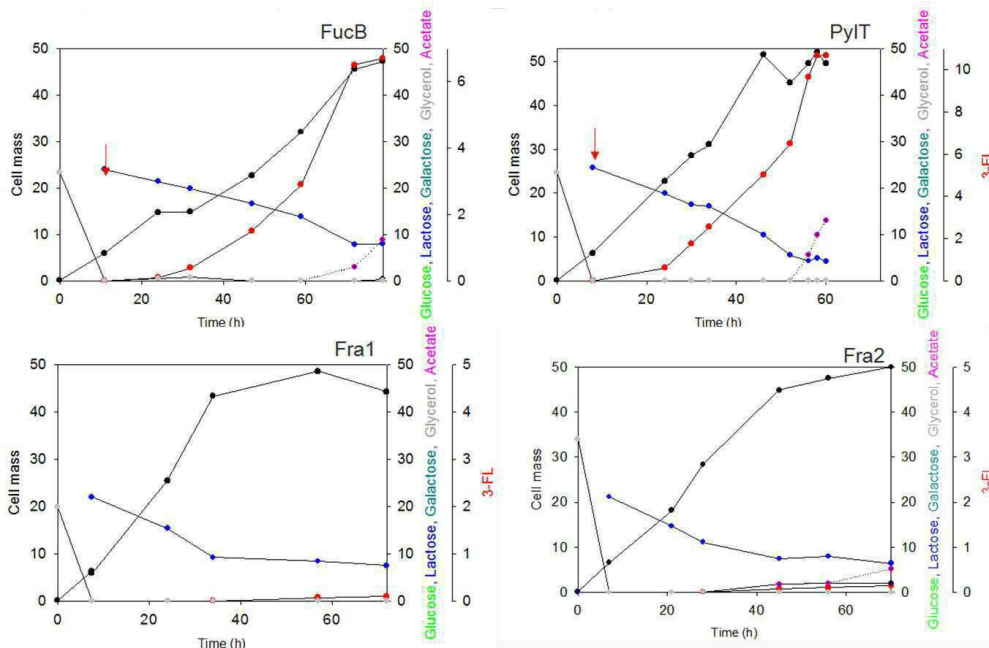
도면1



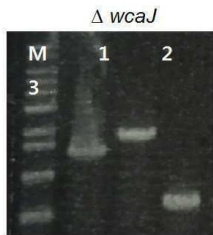
도면2



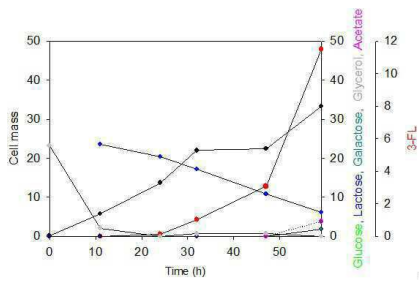
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> SNU R&DB FOUNDATION
- <120> Method for the mass production of 3-fucosyllactose
- <130> AP-2015-0226
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1278

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori ATCC 26695

<400> 1

atgttccaac ccctattaga cgcctttata gaaagcgctt ccattgaaaa aatggcctct 60

aatctcccc cccccccct aaaaatcgct gtggcgaatt ggtggggaga tgaagaatt 120

aaagaattta aaaagagcgt tctttatttt atcctaagcc aacgctacgc aatcaccttc 180

cacaaaaacc ccaatgaatt ttcagatctt gtttttagca atcctcttgg agcggctaga 240

aagattttat cttatcaaaa cactaaacga gtgttttaca ccggtgaaaa cgaatcacct 300

aatttcaacc tctttgatta cgccataggc tttgatgaat tggattttaa tgatcgttat 360

ttgagaatgc ctttgtatta tgcccatttg cactataaag ccgagcttgt taatgacacc 420

actgcgccct acaaaactca 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 agccaatata agttcaatct ctgttttgaa 720

aactcgaag gttatggcta tgtaaccgaa aaaatccttg atgcgtattt tagccatacc 780

attcctatth atggggggag tcccagcgtg gcgaaagatt ttaaccctaa aagttttgtg 840

aatgtgcatg atttcaaca ctttgatgaa gcgattgatt atalcaaata cctgcacacg 900

cacccaaacg cttattttaga catgctctat gaaaaccctt taaacacct tgatgggaaa 960

gcttactttt accaagatth gagtttttaa aaaatcctag atttttttaa aacgatttta 1020

gaaaacgata cgatttatca caaattctca acatctttca tgtgggagta cgatctgcat 1080

aagccgtag tatccattga tgatttgagg gtttaattatg atgatttgag ggtaattat 1140

gaccggcttt tacaaaacgc ttcgccttta ttagaactct ctcaaaacac cactttttaa 1200

atctatcgca aagcttatca aaaatccttg cttttgttgc gcgcggtgag aaagttggtt 1260

aaaaaattgg gtttgtaa 1278

<210> 2

<211> 1365

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori ATCC 43504

<400> 2

atgttccaac ccctattaga cgcctttata gaaagcgctt ccattgaaaa aatggcctct 60

aaatctcccc cccccctaaa aatcgctgtg gcgaattggt ggggagatga agaaattaaa 120

 gaatttaaaa agagcactct gtatttcatt ttaagtcagc attacacaat cactttacac 180
 cgaaaccctg ataaacctgc ggacatcggt tttggtaacc cccttggatc agccagaaaa 240
 atcttatcct atcaaaacac taaacgaata ttttacaccg gtgaaaacga atcgcctaat 300
 ttcaacctct ttgattacgc cataggcttt gatgaattag actttagaga tcggtatttg 360
 agaatgcctt tatattatga taggetacac cataaagccg agagcgtgaa tgacaccacc 420
 gcaccctaca agattaaagg caacagcctt tatactttaa aaaaaccctc ccattgtttt 480
 aaagaaaacc accctaattt gtgcgcgctc atcaataatg agagcgatcc tttgaaaaga 540

 gggtttgcca gttttgtagc gagcaacgct aacgctccta tgaggaacgc tttctatgac 600
 gctttaaatt ctattgagcc agttactggg ggaggagccg tgaaaaacac tttagctat 660
 aaggttggaa acaaaagcga gtttttaagc caatacaaat tcaacctgtg ttttgaaaac 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 gattttagaa 1020
 aacgacacga ttiatcataa taaccctttc attttctatc gtgatttgaa tgagccgtta 1080
 gtatccattg ataatttgag aatcaattat gataatttga gggtaatta tgatgatttg 1140
 agggtaatt atgatgattt gagggttaat tatgatgatt tgagaatcaa ttatgatgat 1200
 ttgagaatca attatgatga tttgagaatt aattatgagc gccttttgca aaacgcttca 1260
 cctttattgg aattgtccca aaacacctct tttaaaatct atcgcaaaat ttatcaaaaa 1320
 tccttacctt tattgcgtgt aataaggagg tgggttaaaa aataa 1365

- <210> 3
- <211> 891
- <212> DNA
- <213> Bacteroides fragilis ATCC 25285
- <400> 3

atggatatat tgattctttt ttataatacg atgtgggat ttccactcga gttccgaaag 60
 gaagatttac ctgggggctg tgtgataacg actgatcgaa acctcattgc aaagcggat 120
 gccgtggttt tccatttgcc cgatttgcc tgggtgatgg aggatgaaat cgataagcgg 180
 gaaggacagc tttgggtggg atggagtctg gaatgtgaag agaattatag ttggcgaag 240

gatcccagat tcagagagag ttttgactta tggatggggt atcatcagga g gatgatatt 300
 gtgtatcctt attatggacc ggattatggg aagatgctgg ttacggcacg gagggaaaag 360

ccttataaga agaaggcatg tatgtttatt tcgagtgata tgaaccggag tcaccgacaa 420
 gagtatctta aggaattgat gcagtatacc gacatcgatt cgtatgggaa actataccgt 480
 aattgtgaat tacctgttga ggatcgggga cgggatacac ttcttagtgt gatcggggat 540
 tatcagtttg tgataagttt tgagaatgcg ataggggaagg attatgtgac agaaaagttt 600
 ttcaatcctt tgttggccgg tactgttccg gtctatctgg gagctcccaa tattcgggaa 660
 tttgctccgg gagaaaattg ttttctggat atttgtactt tcgattctcc cgagggagta 720
 gccgctttta tgaatcaatg ctatgatgac gaggcattgt atgaacgttt ttatgcatgg 780

aggaaacggc ctttattatt gtcgtttaca aataagttag agcaagtccg gagcaatccg 840
 ttaatcagge tttgccaaaa aatacacgaa ctaaaattgg gagggatag a 891

<210> 4
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> Bacteroides fragilis ATCC 25285
 <400> 4

atgaaaaag tattcattcc tataaatacc aaaattctg ttgaaaggca gttccctaat 60
 agagtcccta tttggggaaa ttacgagttt attatatcta ctaaagaacc agagcaagaa 120
 tacgattatg ttgtggtatt agatgacatt gaatattctc ttcgtttgat gtgctgtaag 180
 caaaatatat gtttatttac aggagaacct ccatatgtta agctttatcc tcgtaaatat 240

ttaaaccaat ttgggcatgt ttatactgac caatccagtg tattaaaaag agataatgcc 300
 tgcttatctt atcctgcatt accttggatg ctatattaca atttctataa tgacaaacaa 360
 aaagaagagt tattaataga ttatgatttt ttgaaaaata gaccaacatt acagaggaaa 420
 aataaaatct gcttatttac ttctaataaa aaaatatcta aggggcatat tgaacgcatt 480
 aagtttgcgt tgaattgca agaggaaatg cctgatttga ttgatataa tggttctggc 540
 ttactaatg ttgattataa atatgaagtg atggtacaat ataagtatgc cattgtaata 600
 gaaaactggt catatccgta ttattggact gagaaattgg ctgatacttt ctgttcagga 660

tgctatccga tatattttgg tgatccacat attggagatt ttttttcaa ggaagaaatg 720
 gctgtgattg atattaggaa ttttgatgaa agtaagcaga ctataaaaaa aataatagat 780
 aataatgttt atgagaagca atatgagaat atttgtcatg cacgagacaa aattttagat 840
 aatataata tgttttcttt aatttcgagt aactggatt caatacctgc taagttagat 900

aaggaaaaat tacttctttc tcctatgctg cttagtgttt ttgatagaat tagaaataga 960
atatacaggt tgttttatta g 981

<210> 5
<211> 425
<212> PRT

<213> Helicobacter pylori ATCC 26695
<400> 5

Met Phe Gln Pro Leu Leu Asp Ala Phe Ile Glu Ser Ala Ser Ile Glu
1 5 10 15
Lys Met Ala Ser Lys Ser Pro Pro Pro Pro Leu Lys Ile Ala Val Ala
20 25 30
Asn Trp Trp Gly Asp Glu Glu Ile Lys Glu Phe Lys Lys Ser Val Leu
35 40 45
Tyr Phe Ile Leu Ser Gln Arg Tyr Ala Ile Thr Leu His Gln Asn Pro
50 55 60

Asn Glu Phe Ser Asp Leu Val Phe Ser Asn Pro Leu Gly Ala Ala Arg
65 70 75 80
Lys Ile Leu Ser Tyr Gln Asn Thr Lys Arg Val Phe Tyr Thr Gly Glu
85 90 95
Asn Glu Ser Pro Asn Phe Asn Leu Phe Asp Tyr Ala Ile Gly Phe Asp
100 105 110
Glu Leu Asp Phe Asn Asp Arg Tyr Leu Arg Met Pro Leu Tyr Tyr Ala
115 120 125
His Leu His Tyr Lys Ala Glu Leu Val Asn Asp Thr Thr Ala Pro Tyr
130 135 140
Lys Leu Lys Asp Asn Ser Leu Tyr Ala Leu Lys Lys Pro Ser His His
145 150 155 160
Phe Lys Glu Asn His Pro Asn Leu Cys Ala Val Val Asn Asp Glu Ser
165 170 175
Asp Leu Leu Lys Arg Gly Phe Ala Ser Phe Val Ala Ser Asn Ala Asn
180 185 190
Ala Pro Met Arg Asn Ala Phe Tyr Asp Ala Leu Asn Ser Ile Glu Pro

<212> PRT

<213> Helicobacter pylori ATCC 43504

<400> 6

Met Phe Gln Pro Leu Leu Asp Ala Phe Ile Glu Ser Ala Ser Ile Glu

1 5 10 15

Lys Met Ala Ser Lys Ser Pro Pro Pro Leu Lys Ile Ala Val Ala Asn

20 25 30

Trp Trp Gly Asp Glu Glu Ile Lys Glu Phe Lys Lys Ser Thr Leu Tyr

35 40 45

Phe Ile Leu Ser Gln His Tyr Thr Ile Thr Leu His Arg Asn Pro Asp

50 55 60

Lys Pro Ala Asp Ile Val Phe Gly Asn Pro Leu Gly Ser Ala Arg Lys

65 70 75 80

Ile Leu Ser Tyr Gln Asn Thr Lys Arg Ile Phe Tyr Thr Gly Glu Asn

85 90 95

Glu Ser Pro Asn Phe Asn Leu Phe Asp Tyr Ala Ile Gly Phe Asp Glu

100 105 110

Leu Asp Phe Arg Asp Arg Tyr Leu Arg Met Pro Leu Tyr Tyr Asp Arg

115 120 125

Leu His His Lys Ala Glu Ser Val Asn Asp Thr Thr Ala Pro Tyr Lys

130 135 140

Ile Lys Gly Asn Ser Leu Tyr Thr Leu Lys Lys Pro Ser His Cys Phe

145 150 155 160

Lys Glu Asn His Pro Asn Leu Cys Ala Leu Ile Asn Asn Glu Ser Asp

165 170 175

Pro Leu Lys Arg Gly Phe Ala Ser Phe Val Ala Ser Asn Ala Asn Ala

180 185 190

Pro Met Arg Asn Ala Phe Tyr Asp Ala Leu Asn Ser Ile Glu Pro Val

195 200 205

Thr Gly Gly Gly Ala Val Lys Asn Thr Leu Gly Tyr Lys Val Gly Asn

210 215 220

Lys Ser Glu Phe Leu Ser Gln Tyr Lys Phe Asn Leu Cys Phe Glu Asn

