



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월01일
(11) 등록번호 10-1863321
(24) 등록일자 2018년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/746 (2013.01)
C12N 9/1048 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0102049

(22) 출원일자 2016년08월10일

심사청구일자 2016년08월10일

(65) 공개번호 10-2017-0020258

(43) 공개일자 2017년02월22일

(30) 우선권주장

1020150114469 2015년08월13일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020150031959 A*

Enzyme and Microbial Technology. Vol. 22, No.
6, 페이지 527-531 (1998.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

김도만

강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1, 320동
101호

(74) 대리인

김태선

전체 청구항 수 : 총 1 항

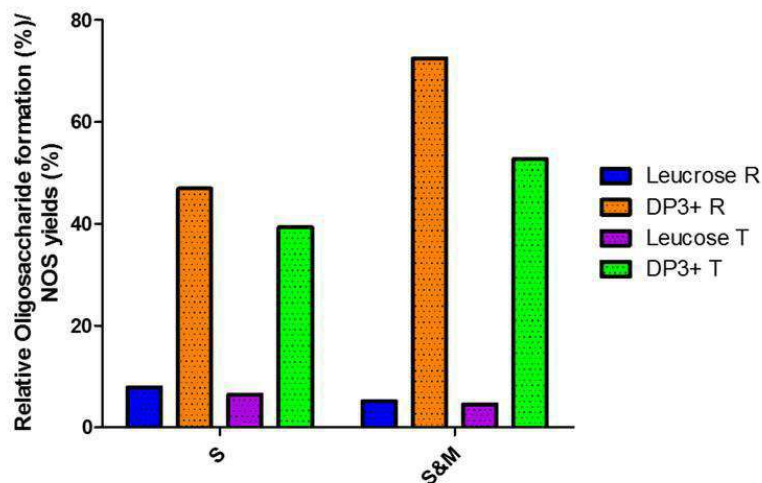
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주

(57) 요약

글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주, 상기 변형 류코노스톡속 균주의 제조 방법, 및 상기 변형 류코노스톡속 균주를 이용한 글루칸수크라아제의 생산 방법이 개시된다. 본 발명에 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주는 모균 보다 효소 생산성이 현저히 증가함으로써, 효소의 산업적 활용 증대를 기대할 수 있게 한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Y 204/01005 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015056929

부처명 교육부

연구관리전문기관 교육부

연구사업명 기초연구사업/이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 난수용성 천연소재의 생물학적 수용화와 강화된 기능 개발 연구

기 여 율 1/10

주관기관 서울대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 710002076HD230

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림축산식품부

연구사업명 농업연구센터(ARC)사업

연구과제명 (2핵심 2협동)전통식품 유래 미생물의 생물전환 기능 활용 식품 안전 소재 개발 및 생산

기 여 율 1/10

주관기관 서울대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545012480

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림축산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 당전이효소기반 효소처리스테비아 개발 및 기능성 연구

기 여 율 8/10

주관기관 서울대학교

연구기간 2016.07.07 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM(KCCM11728P), 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM(KCCM11729P) 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM(KCCM11730P)로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 변형 류코노스톡속 균주를 수용체 반응시키는 단계; 및

상기 수용체 반응에 의해 생성된 난소화성 올리고당을 회수하는 단계를 포함하는 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법에 있어서,

상기 수용체 반응은 28℃에서 말토오스와 반응시키는 것을 포함하는 것인, 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 난소화성 올리고당 합성용 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주, 상기 변형 류코노스톡속 균주의 제조 방법, 상기 변형 류코노스톡속 균주를 이용한 글루칸수크라아제의 생산 방법, 및 상기 변형 류코노스톡속 균주를 이용한 난소화성 올리고당의 고효율 생산 방법이 개시된다.

배경 기술

[0002] 생물체에 존재하는 수천 종의 효소는 생명체의 기능을 유지하기 위하여 필요한 복잡하고 다양한 반응을 매우 효율적으로 진행시키도록 진화되어왔다. 그러나, 이러한 효소를 실제 산업적으로 활용하기 위해서는 반응의 목적에 맞게 효소의 기능을 개량해야 한다. 효소의 특성을 개량하기 위해서는 효소의 구조 등 관련 정보를 기반으로 하는 전통적인 단백질 공학 기술(Protein Engineering)과 효소에 관련된 구체적인 정보가 없이 원하는 방향으로 효소의 기능을 개량하는 방향적 진화(Directed evolution) 방법이 활용될 수 있다. 특히 단백질의 구조나 기능에 대한 정보가 있는 경우에는 일반적으로 부위 특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis) 기술이 주로 개발되어 사용되고 있다.

[0003] 한편, 그람 양성균인 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)는 글루코오스가 주로 α1→6으로 연결되어 있는 다당류인 덱스트란을 생합성하는 효소(덱스트란수크라아제: dextransucrase)를 생산하며, 이 효

소가 설탕을 이용하여 텍스트란을 생합성하는 기작은 다음과 같다:

n 수크로오스 → (글루코오스)_{n-m-w} + (n-m) 프럭토오스 + m 류코노스톡 + w 글루코오스

(n ≫ m 또는 w)

상기 반응은 비가역 반응으로 가장 주된 산물은 고분자량($1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ Da)의 텍스트란과 프럭토오스고, 미량의 류코노스톡(5-0- α -D-glucopyranosyl-D-fructopyranose)와 글루코오스가 생산된다. 각기 다른 류코노스톡 메센테로이드는 다른 종류의 텍스트란수크라아제를 생산하며 이 효소들에 의해서 합성되는 텍스트란들은 모두 가지 결합을 가지는데, 그 결합 형태나 정도는 효소에 따라 각기 다르다. 지금까지 밝혀진 가지결합 중 가장 주된 결합은 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 이며 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 와 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 구조도 보고되어 있다. 지금까지 알려진 류코노스톡균들은 모두 설탕을 효소 생산 기질에 넣어 주어야만 텍스트란수크라아제를 생산할 수 있었다. 하지만 최근에 김과 Robyt은 여러가지 종의 류코노스톡속 균들(예를 들면: NRRL B-512F, B-1142, B-1355, B-742, B-1299)로부터 설탕을 기질에 넣지 않아도 독특한 텍스트란수크라아제를 생산하는 구성적 돌연변이 균주들을 개발하였다(Kim, D, Robyt, J.F.(1995b) *Enz. Microb.Technol.* 17, 689). 즉, 설탕이 아닌 글루코오스와 프럭토오스 등을 탄소원으로 사용하여도 생장시 텍스트란수크라아제를 생산함으로써, 설탕을 포함하는 LM 배지에서 생산하는 경우 글루칸수크라아제가 생산된 텍스트란과 결합된 상태로 얻어지는 것에 비해, 텍스트란에 오염되지 않은 단백질만의 효소를 얻을 수 있게 되었다.

일 예로서, 류코노스톡 메센테로이드 돌연변이 균인 B-512FMCM은 상업적으로 많은 분야에서 이용되고 있는 B-512(F) 텍스트란 생산균으로부터 개발된 것으로, 이 효소에 의해 합성된 텍스트란은모균주의 효소와 같이 95%의 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 과 5%의 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 결합이 가지결합을 형성하는 물질을 합성한다. 글루코오스가 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 과 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합구조로 변갈아가면서 연결된 다당류인 알테난(alternan)은 점도가 낮고 물에 대한 용해성이 우수하며, $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합분해 효소에 분해되지 않아 식품 첨가제, 증량제 등의 많은 이용 가능성을 가지고 있는 물질이다.

선행문헌

1. 대한민국 등록특허 제10-0453576호

발명의 내용

본 발명자들은 상업적으로 요구되는 난소화성 올리고당을 합성하는 글루칸수크라아제를 개발하기 위해 예의 연구를 거듭한 결과, 글루칸수크라아제 생산성이 현저히 개선된 변형 류코노스톡속 균주를 완성하기에 이르렀다.

제1구현예에 따르면,

류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM 및 류코노스톡 시트레움 B-1355C/KM로 이루어진 균으로부터 1종 이상 선택되는 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주가 제공된다.

제2구현예에 따르면,

류코노스톡 메센테로이데스 B-512F, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM로 이루어진 균으로부터 1종 이상의 균주를 돌연변이시키는 단계를 포함하는 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주의 제조 방법이 제공된다.

상기 구현예에 따른 변형 류코노스톡속 균주의 제조 방법에 있어서, 상기 돌연변이는 돌연변이 유발물질 처리에 의한 화학적 돌연변이법, UV 처리에 의한 물리적 변이법 또는 유전공학 조작에 의한 돌연변이법에 의해 수행될 수 있다.

상기 구현예에 따른 변형 류코노스톡속 균주의 제조 방법에 있어서, 상기 돌연변이 유발물질은 NTG(N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine), EMS(ethyl methane sulfonate) 및 트리에틸렌 멜라민(triethylene melamine)으로부터 1종 이상 선택될 수 있다.

제3구현예에 따르면,

류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM로 이루어진 균으로부터 1종 이상 선택되는 변형 류코노스톡속 균주를 글루코오스 또는 수크로오스 함유 배지에서 배양하는 단계; 및

- [0019] 상기 배양에 의해 생성된 글루칸수크라아제를 회수하는 단계를 포함하는 글루칸수크라아제의 생산 방법이 제공된다.
- [0020] 제4구현예에 따르면,
- [0021] 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 변형 류코노스톡속 균주를 수용체와 반응시키는 단계; 및
- [0022] 상기 수용체 반응에 의해 생성된 난소화성 올리고당을 회수하는 단계를 포함하는 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법이 제공된다.
- [0023] 상기 구현예에 따른 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법에 있어서, 상기 수용체는 수크로오스, 류크로오스, 말토오스, 글루코오스, 프럭토오스 및 갈락토오스로부터 선택된 1종 이상으로부터 선택될 수 있다.
- [0024] 상기 구현예에 따른 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법에 있어서, 상기 수용체 반응은 40°에서 말토오스와 반응시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 구현예에 따른 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법에 있어서, 상기 수용체 반응은 45°에서 글루코오스와 반응시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 난소화성 올리고당 합성용 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주는 모균보다 효소 생산성이 현저히 증가함으로써, 효소의 산업적 활용 증대를 기대할 수 있게 한다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 실험예 2에 따른 TLC 결과를 나타낸다.
- 도 2는 실험예 2에 따른 생성 산물에 대한 비교 그래프를 나타낸다.
- 도 3은 실험예 3에 따른 TLC 결과를 나타낸다.
- 도 4는 실험예 4-1에 따른 TLC 결과를 나타낸다.
- 도 5는 실험예 5에 따른 TLC 결과를 나타낸다.
- 도 6은 실험예 6에 따른 TLC 결과를 나타낸다.
- 도 7은 실험예 6에 따른 생성 산물에 대한 비교 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않은 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다. 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사건이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 비록 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실험 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법, 프로토콜 및 시약으로 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0029] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라, 다른 형태, 예를 들어, "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"은 제한적이지 않다.
- [0030] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [0031] 본 발명은 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주 (*Leuconostoc*)를 제공하고자 한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 용어 "글루칸수크라아제(glucansucrase)"는 수크로오스(sucrose)로부터 글루칸(glucan)을

합성하는 효소로서 글리코실트랜스퍼라제(glucosyltransferase) 또는 텍스트란수크라아제(dextranucrase)라고도 한다. 상기 글루칸수크라아제는 주로 류코노스톡속(*Leuconostoc*) 균주 또는 스트렙토코커스속(*Streptococcus*) 균주로부터 생산된다. 상기 두 균주는 그람 양성이며 통성 혐기성 구균으로서 서로 밀접한 관계가 있으나 이들 간에 가장 큰 차이점은 류코노스톡속균주는 효소 생산을 위하여 설당을 요구하는 반면 스트렙토코커스속 균주는 설당을 필요로 하지 않는다. 즉 류코노스톡속 균주는 텍스트란수크라아제를 유도적으로 생산하며 스트렙토코커스속 균주는 텍스트란수크라아제를 지속적으로 생산한다.

[0033] 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)는 글루코스가 주로 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 로 연결되어 있는 텍스트란을 생합성하는 효소를 생산하며, 상기 효소가 수크로오스를 이용하여 텍스트란을 생합성 하는 반응 기작은 다음과 같다:

[0034] 수크로오스 \rightarrow 글루칸(혹은 텍스트란) + 프럭토오스 + 류크로오스

[0035] 상기 효소반응의 주된 산물은 약 $10^7 \sim 10^8$ Da 정도의 고분자량의 글루칸과 프럭토오스며 부산물로는 글루코오스와 류크로오스(5-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructopyranose)가 생산된다..

[0036] 각기 다른 류코노스톡속 균주는 다른 종류의 텍스트란수크라아제를 생산하며 이에 의해 합성되는 텍스트란들은 그의 결합 형태나 정도가 효소에 따라 다르다. 현재까지 텍스트란의 결합은 주로 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 가 알려져 있으며, $\alpha 1 \rightarrow 2$ 및 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 결합도 보고되어 있다. 대부분의 류코노스톡속 균주는 수크로오스를 효소 생산 기질에 넣어 주어야만 텍스트란수크라아제를 생산할 수 있으나, 수크로오스를 기질에 넣지 않아도 독특한 텍스트란수크라아제를 생산하는 구성적 돌연변이 균주들이 개발되어 있다 (Kim, D, Robyt, JF(1995b) Enz. hicrob. TeGhnol.17, 689). 즉, 수크로오스가 아닌 글루코오스와 프럭토오스 등을 탄소원으로 사용하여도 생장시 텍스트란수크라아제를 생산함으로써, 수크로오스를 포함하는 LM 배지에서 생산하는 경우 글루칸수크라아제가 생산된 텍스트란과 결합된 상태로 얻어지는 것에 비해, 텍스트란에 오염되지 않은 단백질 만의 효소를 얻는 것이 가능해 진다.

[0037] 한편, 효소의 고생산 균주의 개발은 산업적으로 매우 큰 의미를 갖는다 효소 생산을 위한 배지의 비용이 전체 효소 생산 비용의 80%를 차지하고 있으므로, 같은 비용의 배지를 사용하여 더 많은 효소를 생산하는 것은 효소의 산업적 활용을 위해 매우 중요하다.

[0038] 제1구현예에 따르면,

[0039] 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주가 제공된다.

[0040] 본 명세서에서 사용된 용어 "변형된(modified)" 또는 "조작된(engineered)" 균주는 유전 물질을 선택된 숙주 또는 모균 내로 도입하여 세포 생리와 생화학을 변형하거나 변경함으로써 생산된다. 유전 물질의 도입을 통하여, 모균은 새로운 성질, 예를 들면, 새로운 세포내 대사산물 또는 더욱 많은 양의 세포내 대사산물을 생산하는 능력을 획득한다. 예를 들면, 유전 물질의 모균내로의 도입은 효소를 생산하는 새롭거나 변형된 능력을 초래한다. 모균에 도입된 유전 물질은 효소의 생산을 위한 생합성 경로에 관여하는 하나 이상의 효소를 코딩하는 유전자 또는 유전자의 일부를 포함하고, 이들 유전자의 발현 또는 발현 조절을 위한 추가 구성요소, 예를 들면, 프로모터 서열을 포함할 수도 있다.

[0041] 상기 구현예에 따른 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM는 류코노스톡 메센테로이데스 B-512를 모균으로 한다. 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-512는 주로 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합의 글루칸을 합성하는 균주로서 산업균의 경우 설당만을 이용하여 효소가 생산되어 왔으며, 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-512의 구성적 돌연변이 균으로서 류코노스톡 메센테로이데스 B-512FMCM은 글루코오스를 이용한 배지에서 6.5 유닛, 수크로오스를 이용한 배지에서는 8.2 유닛으로 효소를 생산하며, 본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM는 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-512FMCM에 비해 190% 이상, 수크로오스를 이용한 경우 160% 이상 효소 생산성이 향상되었다. 한편, 모균인 류코노스톡 메센테로이데스 B-512에 비해 1310배 이상 효소 생산성이 향상되었다.

[0042] 상기 구현예에 따른 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM는 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299를 모균으로 한다. 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299는 주로 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합 및 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 결합을 가지는 글루칸을 합성하는 균주이다. 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299의 구성적 돌연변이 균으로서 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C는 글루코오스를 이용한 배지에서 0.1 유닛, 수크로오스를 이용한 배지에서 0.3 유닛으로 효소를 생산하며, 본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM는 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C에

비해 800% 이상, 수크로오스를 이용한 경우 500% 이상 효소 생산성이 향상되었다. 한편, 모균인 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299에 비해 1150배 이상 효소 생산성이 향상되었다.

- [0043] 상기 구현예에 따른 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM는 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355를 모균으로 한다. 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355는 주로 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 결합 및 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 결합이 번갈아서 형성된 글루칸을 합성하는 균주이다. 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355의 구성적 돌연변이 균으로서 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C는 글루코오스를 이용한 배지에서 0.32 유닛, 수크로오스를 이용한 배지에서 0.6 유닛으로 효소를 생산하며, 본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM는 상기 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C에 비해 300% 이상, 수크로오스를 이용한 경우 280% 이상 효소 생산성이 향상되었다. 한편, 모균인 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355에 비해 85배 이상 효소 생산성이 향상되었다.
- [0044] 제2구현예에 따르면,
- [0045] 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C로 이루어진 균으로부터 1종 이상의 균주를 돌연변이시키는 단계를 포함하는 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주의 제조 방법이 제공된다.
- [0046] 상기 돌연변이는 돌연변이 유발물질 처리에 의한 화학적 돌연변이법, UV 처리에 의한 물리적 돌연변이법 및 유전공학 조작에 의한 돌연변이법 등에 의해 수행될 수 있다.
- [0047] 상기 돌연변이 유발물질은 NTG(N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine), EMS(ethyl methane sulfonate) 및 트리에틸렌 멜라민(triethylene melamine)으로부터 1종 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 제3구현예에 따르면,
- [0049] 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM로 이루어진 균으로부터 1종 이상 선택되는 변형 류코노스톡속 균주를 글루코오스 또는 수크로오스 함유 배지에서 배양하는 단계; 및
- [0050] 상기 배양에 의해 생산된 글루칸수크라아제를 회수하는 단계를 포함하는 글루칸수크라아제의 생산 방법이 제공된다.
- [0051] 제4구현예에 따르면,
- [0052] 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM로 이루어진 균으로부터 1종 이상 선택되는 변형 류코노스톡속 균주를 수용체와 반응시키는 단계; 및
- [0053] 상기 수용체 반응에 의해 생성된 난소화성 올리고당을 회수하는 단계를 포함하는 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법이 제공된다.
- [0054] 상기 구현예에 따른 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법에 있어서, 상기 수용체는 수크로오스, 류크로오스, 말토오스, 글루코오스, 프럭토오스 및 갈락토오스로부터 선택된 1종 이상으로부터 선택될 수 있다.
- [0055] 상기 구현예에 따른 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법에 있어서, 상기 수용체 반응은 40?에서 말토오스와 반응시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 구현예에 따른 난소화성 올리고당의 고효율 생성 방법에 있어서, 상기 수용체 반응은 45?에서 글루코오스와 반응시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 따른 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM, 류코노스톡 메센테로이데스 B-1299C/KM 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM은 2015년 7월 14일 자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 수탁번호 KCCM11728P, 수탁번호 KCCM11729P 및 수탁번호 KCCM11730P로 기탁되었다.
- [0058] 본 발명에 난소화성 올리고당 합성용 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주는 모균 보다 효소 생산성이 현저히 증가함으로써, 효소의 산업적 활용 증대를 기대할 수 있게 한다.
- [0059] 본 발명에 글루칸수크라아제의 고효율 생산을 위한 변형 류코노스톡속 균주는 모균 보다 효소 생산성이 현저히 증가함으로써, 효소의 산업적 활용 증대를 기대할 수 있게 한다.
- [0060] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] <실시예>

[0062] 실시예 1. 모균의 배양

[0063] 글루코오스(18.8 g/L) 또는 수크로오스 (25 g/L), 박토펙톤 (4.2 g/L), 효모 추출물 (4.2 g/L), K_2HPO_4 (글루코오스의 경우 20 g/L, 수크로오스의 경우 16.7 g/L), $MgSO_4$ (0.17 g/L), NaCl (0.008 g/L), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.008 g/L), $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ (0.008 g/L), 및 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.011 g/L)를 포함하는 배지를 준비하고, *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, *L.mesenteroides* B-512FMCM, *L.mesenteroides* B-1299, *L. mesenteroides* B-1299C, *L.mesenteroides* B-1355 및 *L.mesenteroides* B-1355C 균주를 28℃에서 배양하였다.

[0064] 실시예 2. 변형 류코노스톡속 균주의 제작

[0065] 실시예 1에 따른 *L.mesenteroides* B-512FMCM, *L.mesenteroides* B-1299C 및 *L.mesenteroides* B-1355C를 1.2mL의 글루코오스 배지에 접종하여 24시간 동안 배양한 후 200 μ l를 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 그 다음, 상기 분리된 균주들을 200 μ l의 sterile 20mM sodium-citrate buffer pH 6.0로 3회 세척하였다. 세척된 균주에 200 μ l의 500 μ g/ml⁻¹ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) solution을 넣고 21℃의 온도에서 30분 동안 배양하였다. 상기 배양된 균주들을 20mM sodium-citrate buffer pH 6.0로 3회 세척한 후 500 μ l의 글루코오스 배지에 넣고 21℃의 온도에서 3시간 동안 배양하였다. 배양된 균주배양액을 1:10⁵으로 희석한 후, 100 μ l를 글루코오스를 포함하는 아가(agar)배지 (2.5%)에 플레이트팅 했다.

[0066] <실험예>

[0067] 실험예 1. 모균 및 변형 류코노스톡속 균주의 효소 생산성 비교

[0068] 상기 실시예에 따른 각각의 균주들을 글루코오스 및 수크로오스를 포함하는 액체 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 원심분리를 통해 상등액을 얻어 100mM 설탕과 1:1(v/v)로 혼합하였다. 그 다음, 28℃의 온도에서 반응시키고, 반응 후 생성된 당글루칸을 원심 분리하여 모은 뒤 1 M NaOH를 이용하여 녹인 후 TLC에 점적하여 전개시켰다. 전개가 끝나면, 실온에서 건조시킨 후에 에탄올:황산을 9:1로 섞은 발색 시약을 스프레이로 TLC판에 골고루 분사하여 120℃에서 15 내지 20분 동안 태워서 발색한 후 AlphaEase FC 프로그램을 이용하여 활성여부를 계산하고, 그 결과를 표 1에 나타내었다. 효소 1유닛은 반응 조건 1분 하에서 1mM의 프럭토오스를 수크로오스부터 생산하는 효소의 능력을 의미한다.

표 1

[0069]

	글루코오스 배지(IU ml ⁻¹)	수크로오스 배지(IU ml ⁻¹)
B-512F	0	0.01
B-512FMCM	6.5	8.2
B-512F/KM	12.3	13.1
B-1299	0	0.01
B-1299C	0.1	0.3
B-1299C/KM	0.8	1.5
B-1355	0	0.02
B-1355C	0.32	0.6
B-1355C/KM	1.1	1.7

[0070] 실험예 2. 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM을 이용한 다양한 수용체 반응 특성 및 생산 올리고당의 난소 화성 확인

[0071] 수크로오스(S), 류크로오스(L), 말토오스(M), 글루코오스(G), 프럭토오스(F) 및 갈락토오스(G)는 Sigma로부터 구입하고, 효소는 상기 실험예 1에 따라 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM 균주에서 유래한 것을 이용하였다. 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM 균주로부터의 효소 0.9 U/ml를 수크로오스(S) 600mM, 및 수크로오스(S) 600mM 및 말토오스(M) 100mM 혼합물과 각각 28℃에서 6시간 동안 반응(R)시킨 후, 반응산물(Lane 1), 상기 반응 산물에 10 μ l α -amylase/ml를 이용하여 90℃에서 30분 동안 반응시킨 반응산물(Lane 2), 및 상기 10 μ l α -amylase/ml가 처리된 반응산물(Lane 2)에 30 μ l amyloglucosidase/ml을 더욱 처리하여 60℃에서 1시간 동안 반응시킨 반응산물(Lane 3)을 이용하여 얇은막크로마토그래피(TLC)를 수행하였다. 얇은막크로마토그래피 전개

용매로는 nitromethane: n-propanol: water(2:5:1.5, v/v/v)를 사용하여 한 번 전개하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다. 또한, 생성된 산물을 비교하여 도 2에 나타내었다.

[0072] 도 1을 참고하면, 수용체로 말토오스가 첨가된 그룹이 첨가되지 않은 그룹에 비해 상대적으로 반응 부산물인 류크로오스의 양이 감소됨으로써, 올리고당 합성이 더 활발한 것으로 확인되었다. 도 2를 참고하면, 수용체로 말토오스가 첨가된 그룹이 첨가되지 않은 그룹에 비해 수용체로서 말토오스를 첨가한 경우, 중합도 3 이상의 올리고당 합성이 증가되어 있음이 직접적으로 확인되었다.

[0073] 실험예 3. 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM을 이용한 다양한 수용체 반응 특성 및 생산 올리고당의 난소화성 확인

[0074] 상기 실시예 1에 따른 류코노스톡 메센테로이데스B-512F/KM 균주로부터의 효소 5 U/ml를 말토오스(M), 류크로오스(L), 갈락토오스(G), 프럭토오스(F), 글루코오스(G), 및 이들의 조합과 28℃에서 6시간 동안 반응(R)시킨 후, 실험예 2와 동일한 방법으로 반응산물(Lane 1), 반응산물(Lane 2) 및 반응산물(Lane 3)을 이용하여 TLC를 수행하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0075] 도 3을 참고하면, 사용된 수용체에 따라 생산된 당의 종류 및 양에 차이가 나는 것이 확인되었다.

[0076] 실험예 4. 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM의 효소 반응 온도에 따른 난소화성 올리고당 생산 비교

[0077] 4-1. 수용체로서 말토오스를 이용한 경우

[0078] 3M의 수크로오스에 말토오스를 각각 0mM(R1), 25mM(R2), 50mM(R3), 100mM(R4), 600mM(R5)씩 가하고, 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM로부터의 텍스트란수크라아제 60 U/ml를 사용하여 각각 28℃ 및 40℃에서 6시간 동안 6시간 동안 반응(R)시킨 후, 반응산물(Lane 1), 및 상기 반응 산물에 10 μ l α -amylase/ml를 이용하여 90℃에서 30분 동안 반응시킨 후 30 μ l amyloglucosidase/ml을 더욱 처리하여 60℃에서 1시간 동안 반응시킨 반응산물(Lane 2)을 이용하여 TLC를 수행하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. 또한, 생성된 산물을 비교하여 하기의 표 2에 나타내었다.

[0079] [표 2]

반응온도 28°										
반응조건	3M S		3M S + 25 mM M		3M S + 50 mM M		3M S + 100 mM M		3M S + 600mM M	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
F + G	17.48	26.38	16.97	28.47	17.12	27.29	17.61	26.67	14.50	40.82
이당류	5.74	18.84	5.80	20.24	5.73	19.06	5.36	20.80	14.82	11.03
Leucrose	14.82	15.99	14.68	15.35	15.02	16.17	15.95	16.83	12.03	15.74
3당 이상	61.96	38.78	62.55	35.95	62.13	37.47	61.08	35.70	58.64	32.41
반응온도 40°										
F + G	19.07	29.06	17.79	25.97	18.27	25.79	16.69	22.96	11.96	29.49
이당류	7.78	21.46	7.16	20.58	7.49	19.85	7.77	20.37	18.72	22.27
Leucrose	11.46	12.74	11.90	13.53	11.26	12.53	10.43	12.25	11.07	12.12
3당 이상	61.70	36.74	63.15	39.92	62.98	41.83	65.11	44.41	58.25	36.12

[0080]

[0081] 도 4와 표 2를 참고하면, 수용체 반응의 부산물인 류크로오스의 양이 40℃에서 감소되어 중합도 3 이상의 올리고당 합성이 증가되어 있음이 확인되었다. 특히, 40℃에서 수용체로 말토오스 100mM를 가한 경우가 국제식품규격위원회(CODEX) 기준에서 저분자성 식이섬유로 분류되는 난소화성 소당류인 난소화성 올리고당의 생성이 가장 많은 것으로 확인되었다.

[0082] 4-2. 수용체로서 글루코오스를 이용한 경우

[0083] 3M의 수크로오스에 글루코오스를 각각 50mM, 100mM, 200mM 및 500mM씩 가하고, 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM로부터의 텍스트란수크라아제 60 U/ml를 사용하여 각각 40℃ 및 45℃에서 6시간 동안 반응시킨 후, 반응산물(before), 및 상기 반응 산물에 10 μ l α -amylase/ml 를 이용하여 90℃에서 30분 동안 반응시킨 후 30 μ l amyloglucosidase/ml을 더욱 처리하여 60℃에서 1시간 동안 반응시킨 반응산물(after)을 비교하여 하기의 표 3에 나타내었다.

[0084] [표 3]

반응온도 40°								
반응조건	3M S + 50 mM G		3M S + 100 mM G		3M S + 200 mM M		3M S + 500 mM M	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
F + G	18.43	30.04	17.53	29.88	19.25	27.31	17.31	27.98
DP2	6.00	19.24	10.55	20.29	12.23	21.56	15.91	26.25
Leucrose	15.69	15.90	13.92	16.90	13.88	15.62	12.90	16.87
3당 이상	59.88	34.83	58.00	32.93	54.64	35.51	53.87	28.90
반응온도 45°								
F + G	21.56	28.02	17.10	27.00	17.92	29.75	15.49	28.55
DP2	11.64	22.25	9.61	19.69	10.65	18.58	16.59	23.13
Leucrose	14.08	14.85	12.90	15.57	13.13	15.23	12.27	15.93
3당 이상	52.72	34.88	60.38	37.74	58.29	36.44	55.65	32.39

[0085]

[0086] 표 3을 참고하면, 45℃에서 수용체로 글루코오스 100mM를 가한 경우 효소분해 반응 후에도 3 이상의 당이 37.74로 나타나 난소화성 올리고당의 생성이 가장 많은 것으로 확인되었다.

[0087] 실험예 5. 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM 및 B-1299C/KM의 효소 반응 온도에 따른 난소화성 올리고당 생산 비교

[0088] 3M의 수크로오스(S)에 말토오스(M) 50mM를 가한 후 류코노스톡 메센테로이데스B-512F/KM 균주 유래 텍스트란수크라아제 60 U/ml과 류코노스톡 메센테로이데스B-1299C/KM 균주 유래 텍스트란수크라아제 0.2 U/ml을 혼합하였으며 각각 16℃(R1), 23℃(R2), 28℃(R3), 37℃(R4), 40℃(R5) 및 45℃(R6) 에서 6시간 동안 반응시킨 후, 반응산물(Lane 1), 및 상기 반응 산물에 10 μl α-amylase/ml 를 이용하여 90℃에서 30분 동안 반응시킨 후 30 μl amyloglucosidase/ml을 더욱 처리하여 60℃에서 1시간 동안 반응시킨 반응산물(Lane 2)을 이용하여 TLC를 수행하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 또한, 생성된 산물을 비교하여 하기의 표 4에 나타내었다.

표 4

3M Sucrose												
Composition	16°C		23°C		28°C		37°C		40°C		45°C	
F + G	17.41	26.43	17.32	28.04	17.49	26.06	18.43	27.61	18.42	26.34	18.53	27.39
DP2	8.56	21.60	8.40	21.38	8.32	21.51	6.48	20.53	6.97	21.95	7.62	22.23
Leucrose	15.55	17.97	15.89	16.79	15.26	17.03	14.60	15.34	13.25	13.93	13.59	13.68
DP3+	58.48	34.00	58.39	33.79	58.93	35.40	60.49	36.52	61.36	37.77	60.26	36.70
3M sucrose + 50 mM Maltose												
F + G	16.97	32.01	16.90	29.06	17.16	26.89	17.12	24.61	17.55	27.56	18.98	30.07
DP2	7.90	19.32	8.36	21.29	8.59	23.00	9.33	22.11	9.83	20.55	10.35	21.47
Leucrose	16.06	19.07	15.66	19.30	15.35	19.21	14.41	17.76	13.49	16.31	14.36	15.66
DP3+	59.08	29.60	59.07	30.36	58.91	30.90	59.13	35.52	59.13	35.57	56.31	32.79

[0089]

[0090] 도 5를 참고하면, 수용체 반응 부산물인 류크로오스의 양이 감소되어 있는 것이 확인되어 올리고당 합성이 더 활발한 것으로 간접적으로 확인되었으며, 표4를 참고하면, 수용체로 말토오스가 첨가된 그룹이 첨가되지 않은 그룹에 비해 중합도 3 이상의 올리고당 합성이 증가되어 있음이 직접적으로 확인되었다. 특히 수용체로 말토오스 50mM를 가한 경우 40℃에서 올리고당의 합성이 증가되어 있음이 확인되었다.

[0091] 실험예 6. 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM 및 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM의 효소 반응 온도에 따른 난소화성 올리고당 생산 비교

[0092] 600mM의 수크로오스(S)에 말토오스(M) 100mM를 가한 후 류코노스톡 메센테로이데스 B-512F/KM 균주 유래 텍스트란수크라아제 32 U/ml과 류코노스톡 메센테로이데스 B-1355C/KM 유래 효소 0.9U/ml을 혼합하여 28℃에서 15시간

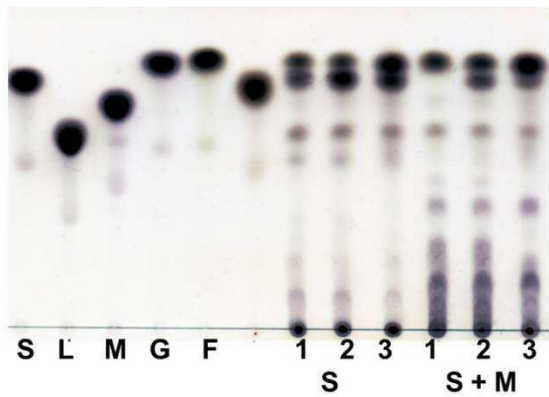
동안 반응을 진행한 후, 실험예 2와 동일한 방법으로 반응산물(Lane 1), 반응산물(Lane 2) 및 반응산물(Lane 3)을 이용하여 TLC를 수행하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다. 또한, 생성된 산물을 비교하여 도 7에 나타내었다

[0093] 도 7을 참고하면, 복합효소를 이용한 그룹은 당분해 효소 처리시 상대적으로 중합도 3 이상의 올리고당 합성물이 상대적으로 많이 남아 있음이 직접적으로 확인되었다.

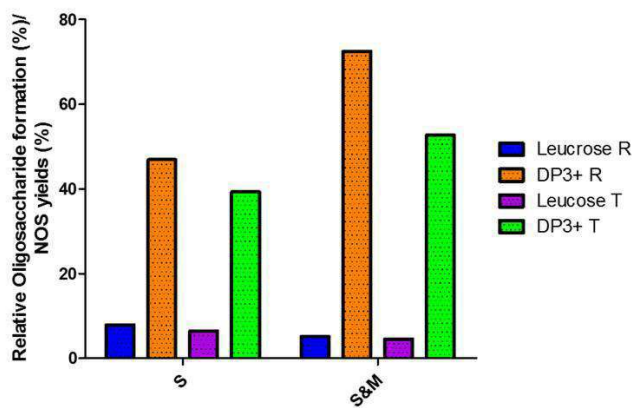
[0094] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

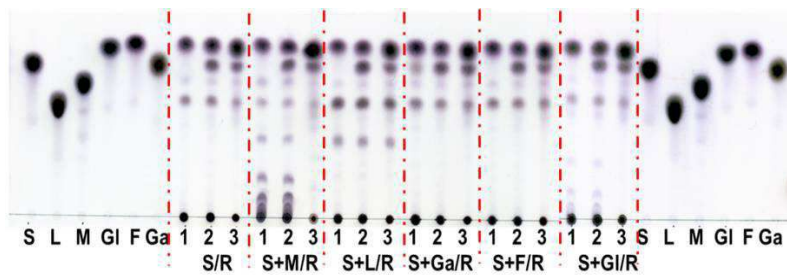
도면1



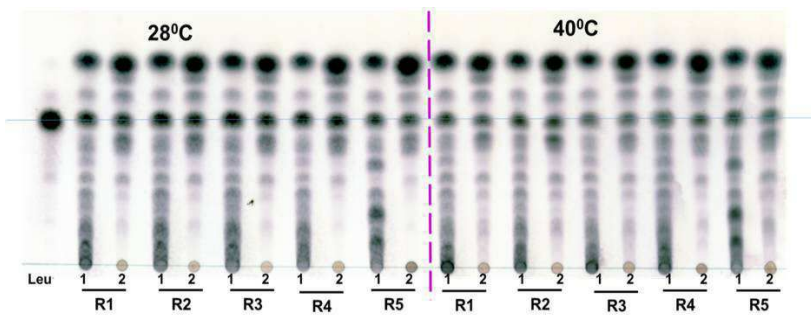
도면2



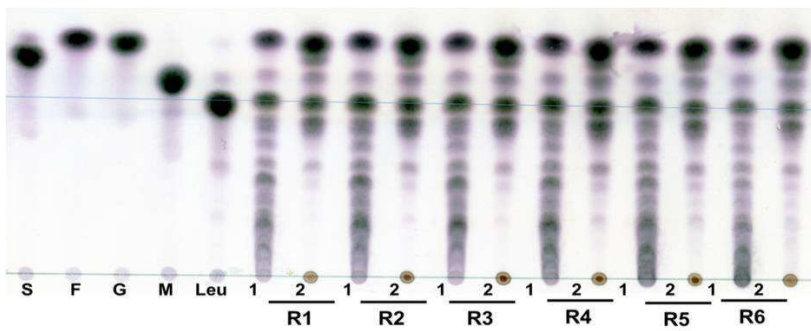
도면3



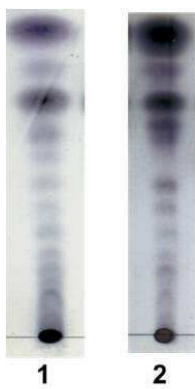
도면4



도면5



도면6



도면7

