



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월08일
(11) 등록번호 10-2050522
(24) 등록일자 2019년11월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/77 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) C12N 9/90 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/77 (2013.01)
C12N 9/1051 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0045845
- (22) 출원일자 2018년04월20일
심사청구일자 2018년04월20일
- (65) 공개번호 10-2018-0118544
- (43) 공개일자 2018년10월31일
- (30) 우선권주장
1020170051871 2017년04월21일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
Bioprocess and Biosystems Engineering. Vol. 36, No. 6, 페이지 749-756 (2013.02.13.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
- (72) 발명자
서진호
서울특별시 서초구 방배로 239 현대멤피시아파트 101동 903호
정상민
경기도 수원시 장안구 대평로 51번길 꽃피노을 한국아파트 253동 501호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 6 항

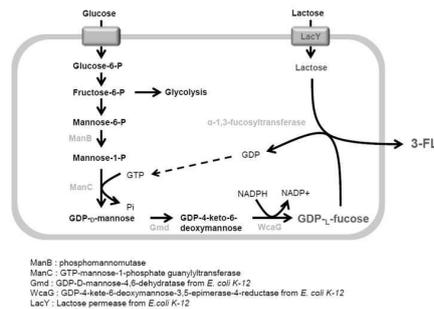
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용한 3'-푸코실락토오스의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용하여 3'-푸코실락토오스를 제조하는 방법에 관한 것으로, GRAS 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 사용하여 3'-푸코실락토오스를 안전하게 생산할 수 있고, 고농도, 고수율, 고생산성으로 3'-푸코실락토오스를 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- C12N 9/1241 (2013.01)
- C12N 9/90 (2013.01)
- C12P 19/04 (2013.01)
- C12Y 101/01271 (2013.01)
- C12Y 204/01065 (2013.01)
- C12Y 207/07013 (2013.01)
- C12Y 306/03018 (2013.01)
- C12Y 402/01047 (2013.01)
- C12Y 504/02008 (2013.01)

전형도

서울특별시 관악구 대학동 220-2번지 401호

(72) 발명자

이도행

서울특별시 관악구 대학동 244-11번지 101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0652-20150015

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌프런티어사업

연구과제명 인간올리고당 Fucosyllactose 생산을 위한 미생물 전환공정

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

α -1,3-푸코오스 전이효소 (α -1,3-fucosyltransferase)가 발현되도록 형질전환되고,
 GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase)가 발현되도록 형질전환되며,
 GDP-L-푸코오스 신타아제 (GDP-L-fucose synthase)가 발현되도록 형질전환되고,
 락토오스 퍼미아제 (lactose permease)가 발현되도록 형질전환되며,
 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase) 및 GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)를 보유하고 있는 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*).

청구항 2

제1항에 있어서,
 상기 α -1,3-푸코오스 전이효소 (α -1,3-fucosyltransferase)는,
 서열번호 5에 기재된 핵산서열로 구성된 *azoT* 유전자로 암호화된 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,
 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰은,
 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase)가 과발현되도록 형질전환되고,
 GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)가 과발현되도록 형질전환된 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰.

청구항 5

락토오스가 첨가된 배지에, 제1항의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 3'-푸코실락토오스의 생산방법.

청구항 6

제5항에 있어서,
 상기 배지는,

글루코오스를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 3'-푸코실락토오스의 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 3'-푸코실락토오스의 생산방법은,

글루코오스 또는 락토오스를 추가로 공급하는 회분식 배양 또는 유가식 배양인 것을 특징으로 하는 3'-푸코실락토오스의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용하여 3'-푸코실락토오스 생산 변이 미생물 및 글루코오스, 락토오스로부터 푸코실락토오스를 제조하는 방법에 관한 것으로, 상세하게는 코리네박테리움에 포스포만노뮤타아제 (phosphomannomutase, *ManB*), 만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase, *ManC*), GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, *Gmd*), GDP-L-푸코오스 신타아제 (GDP-L-fucose synthase, *WcaG*), α -1,3-푸코오스 전이효소 (α -1,3-fucosyltransferase)와 *lacZ*가 제거된 변이 *lac*오페론을 도입시킨 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용하여 3'-푸코실락토오스를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인간의 모유에는 200여종 이상의 각기 다른 구조를 가지는 올리고당 (Human Milk Oligosaccharide, HMO)을 가지고 있으며 이는 다른 포유류에 비해 상당히 높은 농도 (5~15 g/L)로 존재한다. 이러한 HMO는 전생물적 (prebiotic) 효과, 병원균 장내부착 억제 효과 그리고 면역조절시스템 조절효과 등 영유아에게 필수적인 기능성을 지닌다.

[0004] 한편, HMO 중 3'-푸코실락토오스는 다양한 생물학적 활성에 관여하는 주요 HMO인 것으로 보고되고 있다. 3'-푸코실락토오스의 생산방법으로는 직접 모유로부터 추출하는 방법과 화학적 또는 효소적 방법으로 합성하는 방법이 있다. 하지만, 직접 추출하는 방법은 모유수급의 한계와 낮은 생산성이란 단점이 있으며, 화학적 합성법은 고가의 기질, 낮은 이성체 선택성 (stereo-selectivity) 및 생산수율, 독성 유기용매의 사용 등의 문제가 존재한다. 또한, 효소적 합성법은 푸코오스의 공여체 (donor)로 이용되는 GDP-L-fucose가 매우 고가이고, 푸코오스 전이효소 (fucosyltransferase)의 정제비용이 많이 소요되는 단점이 있다.

[0005] 이와 같이 직접추출, 화학적 또는 효소적 생산법은 푸코실락토오스의 대량생산에 적용이 어려운 실정이다. 그러나 미생물을 이용한 생물공학적인 생산방법은, 단순한 공정을 통해 저렴한 기질로부터 푸코실락토오스를 대량으로 생산할 수 있기 때문에, 건강기능성식품 및 의약품 소재로의 개발 가능성을 지닌 3'-푸코실락토오스를 생산을 위한 방법으로 각광받고 있다.

[0006] 한편, 미생물을 이용한 3'-푸코실락토오스 생산에 관한 종래의 기술은 대부분 재조합 대장균을 이용한 생산기술이었다. 실험용으로 이용되는 대장균은 실제로는 병원균이 아니지만 소비자들에게는 해로운 균이라는 인식이 강하고, 세포막 성분이 엔도톡신으로 작용할 수 있기 때문에 분리 정제의 비용이 많이 소비되는 단점이 있어, 식품 및 의약품 소재인 3'-푸코실락토오스를 생산하는 숙주세포로써 대장균을 이용하기에는 어려움이 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1544184호 (등록일자: 2015.08.21)에는, 2'-푸코실락토오스를 생산하기 위한 변이 미생물 및 이를 이용한 2'-푸코실락토오스의 제조방법에 관한 것으로, *lacZ*가 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.

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1648352호 (등록일자: 2016.08.09.)에는 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 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 있는 방법이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명에서는 식품 및 의약품 소재인 푸코실락토오스를 생산하는 숙주세포로서, 대장균보다 안전한 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 이용하되, 고농도, 고수율, 고생산성으로 3'-푸코실락토오스를 생산하는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 α -1,3-푸코오스 전이효소 (α -1,3-fucosyltransferase)가 발현되도록 형질전환되고, GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase)가 발현되도록 형질전환되며, GDP-L-푸코오스 신타아제 (GDP-L-fucose synthase)가 발현되도록 형질전환되고, 락토오즈 퍼미아제 (lactose permease)가 발현되도록 형질전환되며, 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase) 및 GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)를 보유하고 있는 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)를 제공한다.

[0012] 본 발명의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)에 있어서, 상기 α -1,3-푸코오스 전이효소 (α -1,3-fucosyltransferase)는, *azoT* 유전자로 암호화된 것을 사용하는 것이 좋다. 이때, 상기 *azoT* 유전자는, 바람직하게 서열번호 5의 핵산서열로 구성된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)에 있어서, 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰은, 바람직하게 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase)가 과발현되도록 형질전환되고, GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)가 과발현되도록 형질전환된 것이 좋다.

[0014] 본 발명은 락토오스가 첨가된 배지에, α -1,3-푸코오스 전이효소 (α -1,3-fucosyltransferase)가 발현되도록 형질전환되고, GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase)가 발현되도록 형질전환되며, GDP-L-푸코오스 신타아제 (GDP-L-fucose synthase)가 발현되도록 형질전환되고, 락토오즈 퍼미아제 (lactose permease)가 발현되도록 형질전환되며, 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase) 및 GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)를 보유하고 있는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 3'-푸코실락토오스의 생산방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 3'-푸코실락토오스 생산방법에 있어서, 상기 배지는, 바람직하게 글루코오스를 더 포함하는 것이 좋다. 이때, 상기 푸코실락토오스의 생산방법은, 더욱 바람직하게 글루코오스 또는 락토오스를 추가로 공급하는 회분식 배양 또는 유가식 배양인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 의하면, GRAS 균주인 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 균주를 사용하여 3'-푸코실락토오스를 생산할 수 있는데, 종래의 대장균에 비해 안전하게 3'-푸코실락토오스를 생산할 수 있다. 또한, 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용할 경우, 고농도, 고수율, 고생산성으로 3'-푸코실락토오스를 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 코리네박테리움 글루타미쿰 균주에서 GDP-L-fucose 및 3'-푸코실락토오스를 생합성하기 위하여 도입한 대사경로를 도식화한 것이다.

도 2는 코리네박테리움 글루타미쿰 pVBCL + pEGWA (pEGW + azoT)에서 생산된 3'-푸코실락토오스를 HPLC를 통해 측정된 결과이다.

도 3은 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutamicum*) pVBCL + pEGWA를 이용한 플라스크 회분식 배양결과를 나타낸 그래프이다. 광학밀도 (OD₆₀₀)가 약 0.8에 도달하면, IPTG와 락토오스를 최종 농도가 각각 1.0 mM, 10 g/L (화살표)이 되도록 첨가하였다. 그래프 중 기호는 다음과 같다: ●: 건조세포중량, ▲: 글루코오스, ■: 락토오스, ▼: 락테이트, ◆: 3'-푸코실락토오스.

도 4는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutamicum*) pVBCL + pEGWT를 이용한 유가식 배양결과를 나타낸 그래프이다. 초기에 투입한 40 g/L 글루코오스가 모두 소모된 후, 글루코오스를 연속식 (continuous feeding)방법으로 공급하기 시작하였고, IPTG와 락토오스를 동시에 첨가하였다 (화살표). 그래프 중 기호는 다음과 같다: ●: 건조세포중량, ▲: 글루코오스, ■: 락토오스, ▼: 락테이트, ◆: 3'-푸코실락토오스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은, α-1,3-푸코오스 전이효소 (α-1,3-fucosyltransferase)가 발현되도록 형질전환되고, GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase)가 발현되도록 형질전환되며, GDP-L-푸코오스 신타아제 (GDP-L-fucose synthase)가 발현되도록 형질전환되고, 락토오스 퍼미아제 (lactose permease)가 발현되도록 형질전환되며, 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase) 및 GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)를 보유하고 있는 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 제공한다.

[0021] 본 발명자들은 이전에 대한민국 특허출원번호 제10-2016-0012803호 (2016.02.02)를 통해, 대장균을 이용한 3'-푸코실락토오스 생산방법을 출원한 바 있다. 하지만, 3'-푸코실락토오스를 기능성 식품첨가물로 이용함에 있어서, 이를 대장균을 통해 생산하는 것은, 대장균이 갖는 여러 가지 안전상의 염려로 인해 문제가 될 수 있다는 지적이 많다. 따라서, 본 발명에서는 식품안전상 문제가 없는 대체 균주를 통해 3'-푸코실락토오스를 생산해보고자 하였다.

[0022] 본 발명에서는 3'-푸코실락토오스를 생산하는 숙주세포로서 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 선정하였는데, 이 균주는 종래에 사용하던 대장균과는 달리 GRAS (generally recognized as safe)로 인정된 균주일 뿐만 아니라, 엔도톡신을 생산하지 않으며, 식품첨가물인 아미노산 및 핵산의 산업적 생산에 널리 이용되고 있는 균주이다. 따라서, 코리네박테리움 글루타미쿰은 식품 및 의약품 소재의 생산을 위해 적합한 균주라 할 수 있고, 안전성 측면에 대한 소비자에 대한 우려를 불식시킬 수 있는 장점이 있다.

[0023] 그런데, 대장균과 코리네박테리움 글루타미쿰은 균주 자체의 유전적 특성이 다르기 때문에, 대장균에 적용하였던 전략과는 다른 전략을 사용해야 한다. 3'-푸코실락토오스를 생산하기 위해 대장균이든 코리네박테리움 글루타미쿰이든 기본적으로 외래의 α-1,3-푸코오스 전이효소 (α-1,3-fucosyltransferase)를 도입해야 하는 것은 동일하나, 코리네박테리움 글루타미쿰은 그 외에 추가적으로 GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, *Gmd*), GDP-L-푸코오스 신타아제 (GDP-L-fucose synthase, 이 효소는 'GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-reductase'로도 불림. 또한, 약어로는 '*WcaG*'로 불리는데, 이 효소를 암호화하는 유전자를 특히 '*WcaG*'로 부름), 락토오스 퍼미아제 (lactose permease, *LacY*)를 도입해야 한다. 즉, 대장균에는 GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, *Gmd*), GDP-L-푸코오스 신타아제 (GDP-L-fucose synthase, *WcaG*), 락토오스 퍼미아제 (lactose permease, *LacY*)를 암호화하는 유전자를 가지고 있으나, 코리네박테리움 글루타미쿰 균주는 상기 효소들을 암호화하는 유전자를 가지고 있지 않기 때문에, 이를 외부에서 도입시켜 이를 발현시켜 주어야 하는 것이다.

[0024] 이때, 바람직하게 상기 α-1,3-푸코오스 전이효소 (α-1,3-fucosyltransferase)를 암호화하는 유전자는 바람직하게 아조스피릴럼 브라질렌스(*Azospirillum brasilense*)에서 유래한 유전자(*azoT*)를 사용하는 것이 좋다. 또한, GDP-D-만노오스-4,6-데하이드라타아제 (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, *Gmd*), GDP-L-푸코오스 신타아제 (GDP-L-fucose-synthase, *WcaG*) 및 락토오스 퍼미아제 (lactose permease, *LacY*)를 암호화하는 유전자는 대장

균에서 유래한 것을 사용하는 것이 좋다.

- [0025] 한편, 본 발명의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰은 바람직하게 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase)가 과발현되도록 형질전환되고, GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)가 과발현되도록 형질전환된 것이 좋다. 코리네박테리움 글루타미쿰은 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase, *ManB*), GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐릴트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase, *ManC*)를 암호화하는 유전자를 자체적으로 보유하여 발현시킬 수 있기 때문에, 균이 이 효소를 암호화하는 유전자를 도입시켜줄 필요는 없으나, 대량 생산을 위해서는 이 효소를 과발현시켜줄 필요가 있다. 따라서, 본 발명에서는 바람직하게 이들 두 효소를 과발현할 수 있도록 코리네박테리움 글루타미쿰을 형질전환하는 것이 필요한 것이다.
- [0026] 한편, 상기 효소들의 작용은 도 1을 통해서 이해될 수 있으므로, 이에 대한 설명은 생략하기로 한다. 다만, 락토오즈 퍼미아제 (lactose permease, *LacY*)는 균주 외부에 존재하는 락토오스를 균주 내부로 수송하는데 관여하는 효소임을 특별히 밝혀두는 바이다. 하기 본 발명의 실시예에서는 대장균의 *Lac* 오페론에서 *lacZ*가 제거된 *lacYA* 유전자를 도입하여 실험하였으나, 본 발명에서 *Lac* 오페론의 도입 이유가 락토오스의 유입에 관한 것이기 때문에, 균이 *lacA* 유전자까지는 필요 없고, *lacY* 유전자만 도입시켜도 충분하다.
- [0027] 한편, 본 발명에서 사용하는 '발현'이라는 용어는, 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 자체적으로 발현시킬 수 없는 효소를, 인위적으로 발현시키기 위해 외부 유래의 유전자를 균주 내로 도입하여 발현시키는 것을 의미하고, '과발현'이라는 용어는 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰 균주가 자체적으로 해당 효소를 암호화하는 유전자를 가지고 있어, 스스로 발현시킬 수 있으나, 대량생산을 위한 목적으로 이의 발현량을 증대시키기 위해 인위적으로 해당 효소의 발현량을 증대시켜 과발현한 것을 의미한다.
- [0028] 한편, 본 발명자들은 상기에서 설명한 형질전환 전략을 통해, 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutamicum*)에서 모유올리고당인 3'-푸코실락토오스를 대량 생산할 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0029] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 α -1,3-푸코오스 전이효소 (α -1,3-fucosyltransferase)를 코딩하는 유전자는, *azoT* 유전자로 암호화된 것을 사용하는 것이 좋고, 상기 *azoT* 유전자는 바람직하게 서열번호 5의 핵산서열로 구성된 것일 수 있다. α -1,3-푸코실락토오스를 생산하기 위해서는, GDP-L-푸코오스 (GDP-L-fucose)와 락토오즈 (lactose)를 기질로 하여 α -1,3-푸코실락토오스 생산 반응을 수행하는 α -1,3-푸코오스 전이효소 (α -1,3-fucosyltransferase)가 필요하다 (도 1 참조 요망). 이 효소는 다양한 미생물에 존재하는데, 본 발명에서는 아조스피릴럼 브라질렌스(*Azospirillum brasilense*)에서 유래한 유전자(*azoT*)를 사용한 것이다. 다른 유래의 α -1,3-푸코오스 전이효소를 사용한 경우에는 3'-푸코실락토오스의 생산량이 미미하였으나, *azoT* 유전자를 사용한 경우, 다른 유래의 것을 사용하는 것에 비해 3'-푸코실락토오스의 생산량이 현저히 높게 나타났다.
- [0030] 한편, 본 발명은 락토오스가 첨가된 배지에, 본 발명의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰을 배양하는 것을 특징으로 하는 3'-푸코실락토오스의 생산방법을 제공한다. 본 발명의 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 균주를 이용할 경우, 고농도, 고수율, 고생산성으로 3'-푸코실락토오스를 생산할 수 있다.
- [0031] 한편, 상기 본 발명의 3'-푸코실락토오스의 생산방법에 있어서, 상기 배지는, 바람직하게 글루코오스를 더 포함하는 것이 좋다. 글루코오스가 배지에 추가됨으로써 균주의 생육이 활발해져 더욱 높은 생산성으로 3'-푸코실락토오스를 생산할 수 있다.
- [0032] 한편, 상기 본 발명의 3'-푸코실락토오스의 생산방법은, 회분식 또는 락토오스를 추가로 공급하는 유가식 배양을 통해 수행될 수 있다. 회분식 또는 유가식 배양에 관한 세부 지엽적 기술들은 당업계의 공지 기술을 사용할 수 있으므로, 이에 대해서는 그 기재를 생략하기로 한다.
- [0033] 한편, 본 발명의 균주 코리네박테리움 글루타미쿰은, 3'-FL 생산의 기질인 락토오스를 균체 내로 유입하기 위하여 락토오즈 퍼미아제 (lactose permease)를 도입하였다. 즉, 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용하여 3'-FL을 생산하기 위해서는 락토오즈를 균체 내로 유입시킬 수 있는 락토오즈 퍼미아제로 형질전환시켜 줘야 하는데, 본 발명의 균주는 이 효소로 형질전환된 것이다.
- [0034] 그런데, 락토오즈 퍼미아제는 통상적으로 포도당 존재하에서 "glucose repression (포도당 저해)"을 받아 그 활성이 저해된다. 그 결과, 포도당 존재하에서 락토오즈의 유입이 일어나지 못하게 되고, 결과적으로 3-FL을 생산하지 못하게 된다.
- [0035] 하지만, 3'-FL의 생산을 위한 호스트 균주로 본 발명에서 사용한 코리네박테리움 글루타미쿰에서는

"glucose repression (포도당 저해)" 작용이 일어나지 않아, 포도당의 존재하에서도 락토오스의 유입에 따른 3'-FL을 생산할 수가 있었고, 이를 통해 3'-FL의 생산성을 극대화할 수 있었다.

[0036] 한편, 본 발명의 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용한 3'-FL의 생산방법은 3'-FL을 'nongrowth-associated product formation'의 생산 패턴으로 생산함이 본 발명의 하기 실험을 통해 확인되었다.

[0037] 대사산물의 생산이 호스트 균주의 생육과 무관하게 생산되는 'nongrowth-associated product formation'은 대사산물의 생산을 위한 호스트 균주의 생장이 같이 요구되지 않기 때문에, 호스트 균주를 대량으로 배양한 후, 기질을 투입하여 단시간에 대사산물을 대량으로 생산할 수 있는 장점이 있다. 또한, 배양에 사용된 호스트 균주를 반복해서 사용할 수도 있기 때문에 생산성을 극대화시킬 수 있는 장점도 있다. 따라서, 본 발명에서 코리네박테리움 글루타미쿰을 사용하여 구축한 3'-FL 생산방법은 3'-FL의 생산을 극대화 할 수 있는 방법인 것이다.

[0039] 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.

[0041] [실시예 1: 재조합 균주 및 플라스미드 제작]

[0042] 플라스미드 제작을 위해 클로닝은 대장균 (*Escherichia coli* TOP10)을 이용하였고, 3'-푸코실락토오스 (3'-fucosyllactose, 3'-FL)의 생산을 위하여 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032를 이용하였다. 선행연구에서 개발된 *manB* 와 *manC* 그리고 *lacYA* 유전자 클러스터를 발현하는 pVBCL 발현용 플라스미드를 이용하였다. 또한, *gmd*와 *wcaG* 유전자를 발현하는 pEGW 발현용 플라스미드에 α-1,3-푸코오스 전이효소 (α-1,3-fucosyltransferase(azoT))를 발현시키기 위하여 벡터를 구축하였다. 이때, α-1,3-푸코오스 전이효소(azoT)의 유래는 아조스피릴럼 브라질렌스(*Azospirillum brasilense*) ATCC 29145이며, pEGW 벡터에 SacI의 제한효소를 이용하여 α-1,3-푸코오스 전이효소 (azoT)를 삽입하였다.

[0043] 한편, 상기에서 사용된 *manB*, *manC*, *gmd*, *wcaG*, *lacYA* 및 α-1,3-푸코오스 전이효소 (azoT)의 유전자 서열, 균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오티드를 하기 표 1 내지 3에 기재하였다.

표 1

유전자명	서열번호
<i>manB</i>	서열번호 1
<i>manC</i>	서열번호 2
<i>gmd-wcaG</i>	서열번호 3
<i>lacYA</i>	서열번호 4
<i>azoT</i>	서열번호 5

표 2

균주	관련된 특징
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> rpsL(Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
<i>C. glutamicum</i>	Wild-type strain, ATCC 13032
플라스미드	관련된 특징
pEKEx2	Km ^R ; <i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> shuttle vector for regulated gene expression (<i>P</i> _{tac} , <i>lacIq</i> , pBL1, <i>oriVC.g.</i> , <i>oriVE.c.</i>)
pVWEx2	Tc ^R ; <i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> shuttle vector for regulated gene expression (<i>P</i> _{tac} , <i>lacIq</i> , pHM1519, <i>oriVC.g.</i> , <i>oriVE.c.</i>)
pEGW	pEKEx2 + <i>gmd-wcaG</i>
pVBCL	pVWEx2 + <i>manB</i> + <i>manC</i> + <i>lacYA</i>
pEGWA	pEGW + <i>azoT</i>

표 3

프라이머 이름	서열(5'→3')	서열번호
F_inf_sacI_azoT	GCTTTCGGGGTAAGAGCTCAAGGAGATATACAATGCTCGATCAGCGGACAAGC	서열번호 6
R_inf_sacI_azoT	CGGCCAGTGAATTCGAGCTCTTACAGCCGGCTCTCGATCC	서열번호 7

[실시예 2: 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰을 이용한 3'-푸코실락토오스의 생산]

(1) 배양조건 및 방법

종균배양에는 적절한 항생제 (kanamycin 25 µg/mL, tetracycline 5 µg/mL)가 포함된 5 mL의 BHI (Brain Heart Infusion) 배지가 담긴 실험관을 이용하였고, 온도는 30°C, 교반 속도를 250 rpm으로 유지하며 12시간 배양하였다.

회분식 배양은 100 mL ((NH₄)₂SO₄ 20 g/L, urea 5 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ 0.25 g/L, MOPS 42 g/L, CaCl₂ 10 mg/L, Biotin 0.2 mg/L, Protocatechuic acid 30 mg/L, FeSO₄·7H₂O 10 mg/L, MnSO₄·H₂O 10 mg/L, ZnSO₄·7H₂O 1 mg/L, CuSO₄ 0.2 mg/L, NiCl₂·6H₂O 0.02 mg/L, pH7.0)가 담긴 250ml 플라스크에서 30°C로 수행하였다. 교반속도는 250 rpm으로 유지하며 배양하였다. 회분식 배양시에는 광학밀도 (OD₆₀₀)가 0.8에 도달한 시점에서 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), 락토오스를 최종 농도가 각각 1.0mM, 10 g/L가 되도록 첨가하였다.

고농도 세포배양을 위한 유가식 배양은 40 g/L 의 글루코오스 및 적절한 항생제 (kanamycin 25 µg/mL, tetracycline 5 µg/mL)를 포함하는 1.0 L의 최소배지를 포함하는 2.5 L 들이의 생물반응기 (bioreactor, Kbiotech, Incheon, Korea)에서 실시하였다.

초기에 첨가한 글루코오스가 완전히 고갈된 후, 800 g/L의 글루코오스를 포함하는 유입용액 (feeding solution)을 5.7 g/L/h의 속도로 연속식(continuous feeding)방법으로 공급하였다. 이와 동시에, tac 프로모터-매개 유전자 발현을 유도하여 3'-푸코실락토오스를 생산하기 위해 IPTG, 락토오스를 최종 농도가 1.0 mM, 10 g/L가 되도록 첨가하였다.

발효 도중 배지의 pH가 설정포인트 (set-point)보다 더 낮아지면 자동으로 28% NH₄OH가 공급되고, 높아지면 2N HCl이 첨가되어 pH가 일정범위 내 (pH6.98~7.02)에서 유지되도록 하였다. 배지의 pH는 pH 전극 (Mettler Toledo, USA)을 사용하여 실시간으로 측정되었다. 교반 속도 및 통기 속도는 산소결핍을 방지하기 위하여 각각 1000 rpm 및 2 vvm으로 유지하였다.

(2) 세포 및 대사산물의 농도 결정

건조세포중량은 광학밀도 (optical density, OD)에 미리 측정한 변환 상수 0.3을 곱해 결정하였다. 광학밀도 (OD)는 샘플을 적절하게 희석하여 광학밀도를 0.1~0.5 사이의 범위에 맞춘 후에 분광광도계 (spectrophotometer, Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 흡광도 600 nm 에서 측정하였다.

3'-푸코실락토오스, 락토오스, 락테이트, 글루코오스 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 이용하여 측정하였다. 60°C에서 가열된 컬럼을 적용하여 10배 희석된 20 µl의 배양 배지를 분석하였다. 0.6 mL/min 유속으로 5 mM의 H₂SO₄ 용액을 이동상으로 사용하였다.

(3) 회분식 배양을 통한 3 '푸코실락토오스의 생산

3'-푸코실락토오스 생산성능 및 발효특징을 알아보기 위하여 ManB, ManC, Gmd, WcaG, azoT 및 lacZ가 제거된 lac 오페론 (lacYA)을 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰을 각각 플라스크에서 회분식 배양을 실시하였다. 광학밀도 (OD₆₀₀)가 0.8에 도달한 시점에서 IPTG, 락토오스를 최종 농도가 각각 1.0 mM, 10 g/L가 되도록 첨가하였다.

플라스크 회분식 배양의 결과, 390 mg/L의 3'-푸코실락토오스가 생산되었고, 이때의 락토오스 대비 2'-

푸코실락토오스의 수율은 0.32 mole 2'-푸코실락토오스 /mole 락토오스, 생산성은 5.49 mg/L/h였다 (도 3 및 표 4). 도 2는 코리네박테리움 글루타미쿰 pVBCL + pEGWA (pEGW + azoT)에서 생산된 3'-푸코실락토오스를 HPLC를 통해 측정된 결과이다. 상기 회분식 배양의 결과는 하기 표 4에 기재하였으며, 도 3은 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutamicum*) pVBCL + pEGWA를 이용한 플라스크 회분식 배양결과를 나타낸 그래프이다.

표 4

재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutamicum*) pVBCL + pEGWA를 이용한 플라스크 회분식 배양 결과

	최종 건조 세포 중량 (g/L)	락토오스 소모량 ^a (g/L)	최대 3'-푸코실락토오스 농도 ^a (mg/L)	수율 (mole 3'-푸코실락토오스 / mole 락토오스)	생산성 ^a (mg/L/h)
플라스크	12.0	0.71	390	0.38	5.49

^a락토오스의 3'-푸코실락토오스의 농도는 배지에 있는 것만을 정량한 수치임.

(4) 유가식 배양을 통한 3 '푸코실락토오스의 생산

고농도의 세포배양을 통하여 고농도 3'-푸코실락토오스를 생산하기 위해 pVBCL, pEGWA플라스미드를 도입한 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutamicum*)을 이용하여 2.5 L 수준의 발효기에서 유가식 배양을 실시하였다.

초기에 첨가해준 40 g/L의 글루코오스를 모두 소모한 시점부터 세포생장을 유지하기 위해 피딩용액 (feeding solution)을 연속식 (continuous feeding)방법을 이용하여 5.7 g/L/h의 속도로 공급하였다. 이와 동시에 3'-푸코실락토오스의 생산을 유도하기 위해 IPTG와 락토오스를 첨가해 주었다.

실험 결과, 발효가 진행되는 동안 아세트산은 전혀 생성되지 않았으며, 글루코오스의 대사를 통해 세포는 최종적으로 건조세포중량 48.9 g/L에 도달하였다. 또한, 최대 3'-푸코실락토오스의 농도는 3.6 g/L, 락토오스 대비 생산수율은 0.17 mole 3'-푸코실락토오스 /mole 락토오스이고, 생산성은 0.03 g/L/h를 얻을 수 있었다 (도 4 및 표 5).

3'-푸코실락토오스의 생산을 위한 유가식 배양의 결과는 하기 표 5에 기재하였으며, 도 4는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 pVBCL + pEGWA를 이용한 유가식 배양결과를 나타낸 그래프이다.

표 5

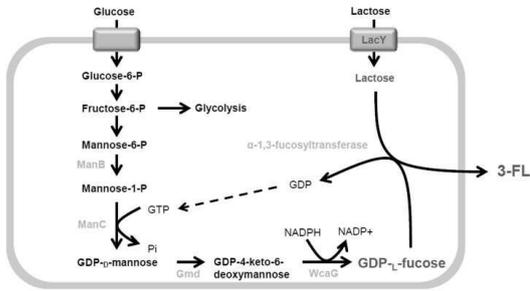
재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*C. glutamicum*) pVBCL + pEGWA를 이용한 유가식 배양 결과

플라스미드	최종 건조 세포 중량 (g/L)	락토오스 소모량 ^a (g/L)	최대 3'-푸코실락토오스 농도 ^a (g/L)	수율(mole 3'-푸코실락토오스 / mole 락토오스)	생산성 ^b (mg/L/h)
pVBCL pEGWA	48.9	15.3	3.6	0.17	0.03

^a락토오스의 3'-푸코실락토오스의 농도는 배지에 있는 것만을 정량한 수치임.
^b3-FL 생산성은 IPTG 인덕션 이후부터 계산한 수치임.

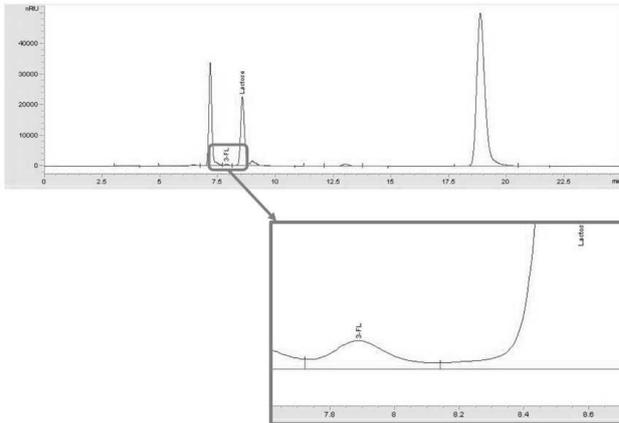
도면

도면1

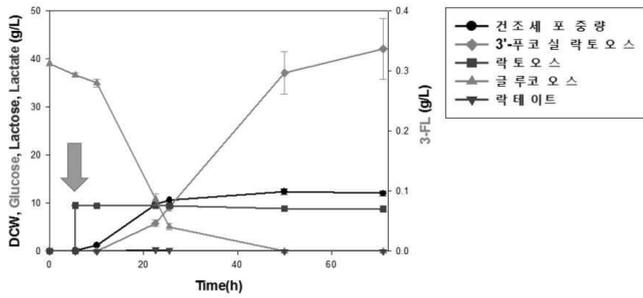


ManB : phosphomannomutase
 ManC : GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase
 Gmd : GDP-D-mannose-4,6-dehydratase from *E. coli* K-12
 WcaG : GDP-4-keto-6-deoxymannose-3,5-epimerase-4-reductase from *E. coli* K-12
 LacY : Lactose permease from *E. coli* K-12

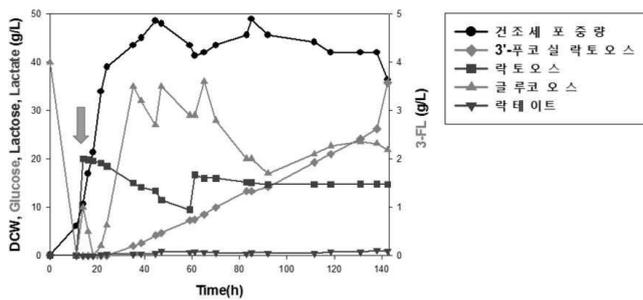
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
- <120> RECOMBINANT CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM FOR THE PRODUCTION OF 3'-FUCOSYLLACTOSE AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF 3'-FUCOSYLLACTOSE THEREFROM
- <130> YP-18-055
- <150> KR 10-2017-0051871
- <151> 2017-04-21
- <160> 7
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1377

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

<400> 1

```

atgcgtaccg gtgaatctgt cacggctgta attaaggcgt atgacgtccg tgggtgtgtt      60

gggtgtcgata ttgatgctga tttcatttct gagactggcg ctgcctttgg tcggctcatg      120
cgtagtgagg gtgaaaccac cgttgtctatt ggccatgaca tgcgtgattc ctcccctgaa      180
ttggccaagg cgtttgccga tggcgtgact gcacagggtt tggatgttgt tcatttggga      240
ctgacttcta ctgatgagct gtactttgcg tccggaacct tgaagtgtgc tgggtcgatg      300
tttactgctg cgcataacc cgctgagtac aacggcatca agttgtgtcg tgcgggtgct      360
cgtccggtcg gtcaggattc tggtttggcc aacatcattg atgatctggt tgagggtgtt      420
ccagcgtttg atggtgagtc aggttcggtt tctgagcagg atttctgag cgcataatgcc      480

gagtacctca atgagcttgt tgatctgaag aacatccgcc cgttgaaggt tgctgtggat      540
gcggaacacg gcatgggtgg gttcactgtc cctgaggtat tcaagggtct gccacttgat      600
gttgcgccac tgtattttga gcttgacggc aatttcccca accatgaggc caatcctctg      660
gagcctgcca acctggttga tttgcagaag tttaccgtag agaccggatc tgatatcggt      720
ttggcgttcg acggcgatgc ggatcgttgc ttcgtgtgtc atgagaaggg ccagccagtc      780
agcccttcgg cgatctgtgc gatcgtagcg gagcgttact tggagaagct tccgggttcc      840
accatcatcc acaacctgat tacctctaag gctgtgacctg aggtgattgc tgaaaacggt      900

ggcactgcgg tgcgtactcg cgtgggtcac tccttcatca aggcgaagat ggcagagacc      960
gggtgcggcct ttggtggcga gcactctgcg cactactact tcaactgagt cttcaatgcg      1020
gactccggca ttttggctgc gatgcacgtg ctggctgcgc tgggaagcca ggaccagcca      1080
ctcagtgaga tgatggctag gtataaccgg tacgttgctt caggcgagtt gaactcccgt      1140
ttggctaata cagaggcgca gcaagagcgc acccaggctg tgctcgatgc gttcgtctgat      1200
cgcaccgagt ccgtggacac ccttgacggc gtgactgtgg aactcaagga cacctccgcg      1260
tggttcaacg tgcgtgcgtc caacaccgag ccgctgcttc gcctcaatgt tgaagctgca      1320

tcgaaggaag aagtcgatgc gttggtagcg gagattctag ggattatccg cgcataa      1377

```

<210> 2

<211> 1089

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
 <400> 2
 atgactttaa ctgacaacag caaaaacgtt gatgctgtca tcttggctcg tggcaaaggt 60
 acccgactgc gccccctgac cgtcaatact ccaaagccaa tgcctgccaac tgctggccac 120
 ccattcttga cccacctttt ggcccccatc aaggcccgag gcatcacaca cgtcgtgctg 180
 ggaacgtcat tcaaagctga agtcttcgag gaatacttcg gagatggctc cghaatgggc 240

 ttggaattg aatatgtcgt cgaggatcag cctttgggca ctggtgggtg catccgaaac 300
 gtctacgaca agctgcgtca cgatactgag attgtgttca acggcgatgt gctctccggt 360
 gcggatctca acagcattct ggacacccac cgcgaaaagg acgcagatct gaccatgcat 420
 ctctgctcgc tagctaacct tcgtgcgttt ggttgcgtcc ccaccgatga ggatggtcgc 480
 gtcagcgaat tctttgaaaa gaccgaagat ccaccaaccg atcagatcaa cgcggtctgc 540
 tacgtgttca agaaggaact catcgagcag atcccggcag gccgagcagt ttccgtcgag 600
 cgcaaacct tcctcagct gttggaagaa ggcaagcgag tcttcggcca cgtcgacgt 660

 tcctactgge ggcacatggg caccccaagc gacttcgtcc gcggtcggc tgacctggtc 720
 cgcggcattg cgtactcccc attgctcga ggcaaaacag gagagtcgct tctcgacgcc 780
 tccgccggcg ttccgacagg cgtctctgtg ctggcgga ccgtagtcgg ccgcggaact 840
 gagatcgggt cggctgccg cgttgacaac actgttttt tgcagggcgt caccattgaa 900
 ccaggtgagg tcattgaaaa ttccatcatt tcctcgggag cacgcatcgg tgctaatgag 960
 cacatctccg gttgcatcat tggcgagggc gcacaggtt gtgctcgggt tgaactcaac 1020
 gcagggatgc gcgtcttccc aggcgttgtg atcccagaca gcggaattcg tttttcgtct 1080

 gatcagtag 1089
 <210> 3
 <211> 2090
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> E.coli K-12 MG1655
 <400> 3
 atgtcaaaag tcgtctcat caccggtgia accggacaag acggttctta cctggcagag 60
 tttctgctgg aaaaaggta cgaggtgcat ggtattaagc gtcgcatc gtcattcaac 120
 accgagcgcg tggatcacat ttatcaggat ccgcacacct gcaaccgaa attccatctg 180
 cattatggcg acctgagtga tacctctaac ctgacgcgca ttttgcgtga agtacagccg 240

gatgaagtgt acaacctggg cgcaatgagc cacgttgcgg tctcttttga gtcaccagaa 300

tataccgctg acgtcgacgc gatgggtacg ctgcgcctgc tggaggcgat ccgcttcctc 360
ggtctggaaa agaaaactcg tttctatcag gcttccacct ctgaactgta tggctctggtg 420
caggaattc cgcagaaaga gaccacgccg tttaccgcg gatctccgta tgcggtcgcc 480
aaactgtacg cctactggat caccgttaac tacctgtaat cctacggcat gtacgcctgt 540
aacggaattc tttcaacca tgaatccccg cgccgaggcg aaaccttcgt tacccgcaaa 600
atcacccgcg caatcgccaa catcgcccag gggctggagt cgtgcctgta cctcggcaat 660
atggattccc tgcgtgactg gggccacgcc aaagactacg taaaaatgca gtggatgatg 720

ctgcagcagg aacagccgga agatttcggt atcgcgaccg gcgttcagta ctccgtgcgt 780
cagttcgtgg aaatggcggc agcacagctg ggcatcaaac tgcgctttga aggcacgggc 840
gttgaagaga agggcattgt ggtttccgtc accgggcatg acgcgccggg cgttaaaccg 900
ggtgatgta ttatcgctgt tgaccgcgt tacttccgtc cggctgaagt taaaacgctg 960
ctcggcgacc cgaccaaagc gcacgaaaaa ctgggctgga aaccggaaat caccctcaga 1020
gagatggtgt ctgaaatggt ggctaatac ctggaagcgg cgaaaaaaca ctctctgctg 1080
aaatctcacg gctacgactg ggcgatcgcg ctggagtcac aagcatgagt aaacaacgag 1140

tttttattgc tggatcatgc gggatggtcg gttccgcat caggcggcag ctgcaacagc 1200
gcggtgatgt ggaactggta ttacgcacc gcgacgagct gaacctgctg gacagccgcg 1260
ccgtgcatga tttctttgcc agcgaacgta ttgaccaggt ctatctggcg gcggcgaag 1320
tgggcggcat tgttgccaac aacacctatc cggcggattt catctaccag aacatgatga 1380
ttgagagcaa catcattcac gccgcgcatc agaacgacgt gaacaaactg ctgtttctcg 1440
gatgctcctg catctaccgc aaactggcaa aacagccgat ggcagaaaagc gagttgttgc 1500
agggcacgct ggagccgact aacgagcctt atgctattgc caaaatcgcc gggatcaaac 1560

tgtgcgaatc atacaaccgc cagtacggac gcgattaccg ctcagtcagc ccgaccaacc 1620
tgtacgggcc acacgacaac ttccaccga gtaattcgca tgtgatccca gcattgctgc 1680
gtcgcttcca cgaggcgacg gcacagaatg cgccggacgt ggtggtatgg ggcagcggta 1740
caccgatcgc cgaatttctg cacgtcgatg atatggcggc ggcgagcatt catgtcatgg 1800
agctggcgca tgaagtctgg ctggagaaca cccagccgat gttgtcgcac attaacgtcg 1860
gcacgggctg tgaactgact atccgcgagc tggcgcaaac catcgccaaa gtggtgggtt 1920
acaaaggccg ggtggttttt gatgccagca aaccggatgg cacgccgcgc aaactgctgg 1980

atgtgacgcg cctgcatcag cttggctggt atcacgaaat ctcaactggaa gcggggcttg 2040
ccagcactta ccagtggttc cttgagaatc aagaccgctt tcgggggtaa 2090
<210> 4
<211> 3335
<212> DNA
<213> Unknown
<220><223> E.coli BL21star(DE3)
<400> 4
accatcgaat ggcgcaaaac ctttcgcggt atggcatgat agcgcgccgga agagagtcaa 60
ttcagggtgg tgaatgtgaa accagtaacg ttatac gatg tcgcagagta tgccggtgtc 120
tcttatcaga ccgtttcccg cgtggtgaac caggccagcc acgtttctgc gaaaacgagg 180
gaaaaagtgg aagcggcgat ggcggagctg aattacattc ccaaccgctg ggcacaacaa 240
ctggcgggca aacagtcggt gctgattggc gttgccacct ccagtcctggc cctgcacgcg 300
ccgtcgcaaa ttgtcgcggc gattaaatct cgcgccgac aactgggtgc cagcgtggtg 360
gtgtc gatg tagaacgaag cggcgtcgaa gcctgtaaag cggcgggtgca caatcttctc 420
gcgcaacgcg tcagtgggct gatcattaac tatccgctgg atgaccagga tgccattgct 480
gtggaagctg cctgcactaa tgttcggcg ttatttcttg atgtctctga ccagacaccc 540
atcaacagta ttatttctc ccatgaagac ggtacgacgac tgggcgtgga gcatctggtc 600
gcattgggtc accagcaaat cgcgctgtta gcgggcccat taagtctgt ctcggcgctg 660
ctgctctgg ctggctggca taaatatctc actcgcaatc aaattcagcc gatagcggaa 720
cgggaaggcg actggagtc catgtccggt tttcaacaaa ccatgcaaat gctgaatgag 780
ggcatcgttc ccaactcgat gctggttggc aacgatcaga tggcgtggg cgcaatgcgc 840
gccattaccg agtccgggct gcgcttgggt gcggatatct cggtagtggg atacgacgat 900
accgaagaca gctcatgta taccgcccg ttaaccacca tcaaacagga ttttcgctg 960
ctggggcaaa ccagcgtgga ccgcttctg caactctctc agggccaggc ggtgaagggc 1020
aatcagctgt tgcccgtctc actggtgaaa agaaaaacca ccctggcgcc caatacga 1080
accgctctc cccgcgctt ggccgattca ttaatgcagc tggcagcaca ggtttccga 1140
ctggaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attagcacc 1200
ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtg ggaattgtga gcggataaca 1260
atttcacaca ggaacagct atgtactatt taaaaaacac aaacttttgg atgttcggtt 1320
tattctttt ctttacttt tttatcatgg gagcctactt cccgttttc cegatttggc 1380
tacatgacat caaccatc agcaaaagt ataccgggtat ttttttggc gctatttctc 1440

tgttctcgct attattccaa ccgctgtttg gctcgtttc tgacaaactc gggctgcgca	1500
aatacctgct gtggattatt accggcatgt tagtgatgtt tgcgccgttc tttatittta	1560
tcttcgggce actgttacia tacaacattt tagtaggacg gattgttggg ggtatttate	1620
taggcttttg ttttaacgcc ggtgcgccag cagtagaggc atttattgag aaagtacgcc	1680
gtcgcagtaa tttcgaattt ggtcgcgcgc ggatgtttgg ctgtgttggc tgggcgctgt	1740
gtgcctcgat tgcggcatc atgttcacca tcaataatca gtttgtttc tggctgggct	1800
ctggctgtgc actcatcctc gccgttttac tctttttcgc caaacggat gcgccctctt	1860
ctgccacggg tgccaatgcg gtaggtgcca accattcggc atttagcctt aagctggcac	1920
tggaactgtt cagacagcca aaactgtggt ttttgtcact gtatgttatt ggcgtttcct	1980
gcacctacga tgtttttgac caacagtttg ctaatttctt tacttcgttc tttgctaccg	2040
gtgaacaggg tacgagggta tttggctacg taacgacaat gggcgaatta cttaacgcct	2100
cgattatgtt ctttgcgcca ctgatcatta atcgcacggt tgggaaaaac gcctctctgc	2160
tggctggcac tattatgtct gtacgtatta ttggctcacc gttcggcacc tcagcctggg	2220
aagtgtttat tctgaaaaac ctgcatatgt ttgaagtacc gttcctgctg gtgggctgct	2280
ttaaataat taccagccag tttgaagtgc gtttttcagc gacgattat ctggtctgtt	2340
tctgcttctt taagcaactg gcgatgattt ttatgtctgt actggcgggc aatatgtatg	2400
aaagcatcgg tttccagggc gcttatctgg tctgggtctt ggtggcgtg ggcttcacct	2460
taatttccgt gttcacgctt agcggccccg gcccgctttc cctgctgctg cgtcaggtga	2520
atgaagtgc ttaagcaatc aatgtcggat gcggcgcgag cgccttatcc gaccaacata	2580
tcataacgga gtgatcgcat tgaacatgcc aatgaccgaa agaataagag caggcaagct	2640
atttaccgat atgtgcgaag gcttaccgga aaaaagactt cgtgggaaaa cgttaatgta	2700
tgagttaat cactcgcac cactcagaagt tgaaaaaaga gaaagcctga ttaaagaat	2760
gtttgccacg gtaggggaaa acgcctgggt agaaccgct gtctatttct cttacggttc	2820
caacatccat ataggccgca atttttatgc aaatttcaat ttaaccattg tcgatgacta	2880
cacggttaaca atcgggtgata acgtactgat tgcaccaac gttactcttt cgttacggg	2940
acacctgta caccatgaat tgagaaaaaa cggcggatg tactcttttc cgataacgat	3000
tggcaataac gtctggatcg gaagtcattt ggttattaat ccaggcgtca ccatcgggga	3060
taattctgtt attggcgcgg gtagtctcgt cacaaaagac attccaccaa acgtcgtggc	3120
ggctggcgtt ccttgtcggg ttattcgcga aataaacgac cgggataagc actattattt	3180

caaagattat aaagttgaat cgtcagttta aattataaaa attgctgat acgctgcgct 3240
 tatcaggcct acaagttcag cgatctacat tagccgcac cggcatgaac aaagcgcagg 3300
 aacaagcgtc gcatcatgcc tctttgacce acagc 3335
 <210> 5
 <211> 978
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Azospirillum brasilense ATCC 29145
 <400> 5
 atgctcgatc agcggacaag cgcgtttctt gaggaattcc tggcgaagcc gggcggcgat 60
 cccgagcggc tcgaccgctt cctgtctcac ggccccgtacc gcggccggcg cggcggcaaa 120

 ccgcggtga agctggcctt ccacgacttc tggccggagt tcgacaaggg cacgaacttc 180
 ttcatcgaga tctgtccag ccgcttcgac ctgtcggagg tcgaggacga cagcgacctc 240
 gccatcgtgt cggctctcgg cgggcccgcac cgcgaggcgc gcagcccgcc caccctgttc 300
 ttcaccgggg agaacgtcgc cccgccgttg gacggcttcg acatggcggg gtccttcgac 360
 cgcgtcgacg acccgcgcca ttaccgctg ccgctctacg tcatgcacgc ctacgagcac 420
 atgcccggagg gggcgggtcc gcatttctgt tcgccgtcc tgcccgggt gccgccgacg 480
 cggcggcct tcgcccggcg cggcttctgc gccttctct acaagaacc gaacggggag 540

 cgcccgaacc gcttcttccc ggtgctggac gggcggcggc gcgtcgattc ggtgggctgg 600
 cacctgaaca acaccggcag cgtcgtcaag atgggctggc tgtcgaagat ccgctcttc 660
 gaacgtacc gtttcgctt cgccttcgag aacccagcc atcccggcta tctgacggaa 720
 aagatcctgg acgtcttcca ggcccgggcg gtcccgtct attggggtga tcccacctg 780
 gagcgcgagg tggcggtcgg cagcttcacg gacgtgtcgc gcttcgccac ggacgaggag 840
 gcggtggacc acatccttg ggtggacgac gattacgacg cctattgcgc ccaccgcgc 900
 gtggcgcct tctggggac ggaggagttt tatttcgacg cctaccgct cggcactgg 960

 atcgagagcc ggctgtaa 978
 <210> 6
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F_inf_sac1_azoT
 <400> 6

gctttcgggg gtaagagctc aaggagatat acaatgctcg atcagcggac aagc 54
<210> 7
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> R_inf_sac1_azoT
<400> 7
cggccagtga attcagctc ttacagccgg ctctcgatcc 40

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

【변경전】

상기 푸코실락토오스의

【변경후】

상기 3'-푸코실락토오스의