



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0034132
(43) 공개일자 2024년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0116810
(22) 출원일자 2023년09월04일
심사청구일자 2023년09월04일
(30) 우선권주장
1020220112653 2022년09월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 삼풍아파트 18동 805호
유소라
서울특별시 성북구 안암로 145, CJ식품안전관 209호(안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)
(74) 대리인
특허법인다나

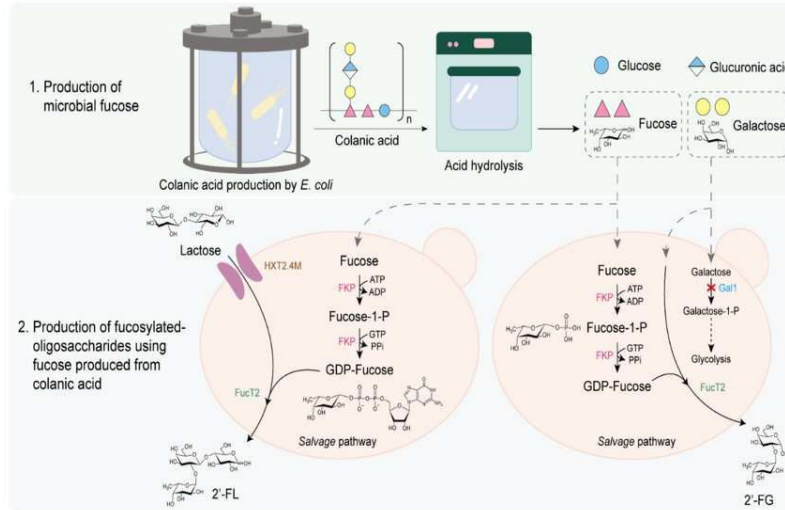
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 콜라닌산으로부터 퓨코실화 올리고당의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 콜라닌산의 산가수분해 조건을 최적화하고, 콜라닌산 가수분해물을 기질로 사용하여 퓨코실화 올리고당을 생산하는 방법에 대한 것이다. 본 발명은 콜라닌산으로부터 퓨코스를 고수율로 얻을 수 있는 최적의 산가수분해 방법을 제공함으로써 이용하여 퓨코실화락토스 및 퓨코실화갈락토스와 같은 기능성 퓨코실화올리고당의 대량 생산에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/81 (2013.01)

(72) 발명자

한나리

세종특별자치시 보듬4로 19(도담동 도람마을12
단지) 1204동 1703호

윤은주

서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호(시흥
동, 현대빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545024879
과제번호	321036052SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	마이크로바이옴 타겟 포스트바이오틱스 발굴 및 소재화 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 콜라닉산을 산가수분해하여 푸코스를 생산하는 단계; 및
- (2) 단계(1)에서 생산된 푸코스를 락토스와 함께 기질로 이용하여 푸코실화락토스를 생산하는 단계를 포함하는 콜라닉산으로부터 푸코실화 올리고당 생산 방법.

청구항 2

- (1) 콜라닉산을 산가수분해하여 푸코스 및 갈락토스를 생산하는 단계; 및
- (2) 단계(1)에서 생산된 푸코스 및 갈락토스를 기질로 푸코실화갈락토스를 생산하는 단계를 포함하는 콜라닉산으로부터 푸코실화 올리고당 생산 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 단계 (1)의 산가수분해는 1 내기 8(% , w/v) 약산을 사용하여, 50 내지 150℃에서 10 내지 100분간 수행되는 것인 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 단계 (2)는 하기 효소, 또는 하기 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 미생물에 의해 수행되는 방법:

- (1) L-푸코카이네이스/5'-다이포스페이트-푸코스(GDP-푸코스)포스포릴레이스;
- (2) α -1,2-푸코실 전이효소; 및
- (3) 헥소스 수송체.

청구항 5

제 4항에 있어서,

L-푸코카이네이스/5'-다이포스페이트-푸코스(GDP-푸코스)포스포릴레이스는 서열번호 1로 표시되고, α -1,2-푸코실 전이효소는 서열번호 3으로 표시되며, 헥소스 수송체는 서열번호 5로 표시되는 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

제 4항에 있어서, 상기 재조합 미생물은 사카로마이세스 세레비시아이인 방법.

청구항 7

제 2항에 있어서,

상기 단계 (2)는 하기 효소, 또는 하기 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 재조합 미생물에 의해 수행되는 방법:

- (1) L-퓨코카이네이스/5'-다이포스페이트-퓨코스(GDP-퓨코스)포스포릴레이스; 및
- (2) α -1,2-퓨코실 전이효소.

청구항 8

제 7항에 있어서,

L-퓨코카이네이스/5'-다이포스페이트-퓨코스(GDP-퓨코스)포스포릴레이스는 서열번호 1로 표시되고, α -1,2-퓨코실 전이효소는 서열번호 3으로 표시되는 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 *GAL1* 유전자가 결실된 사카로마이세스 세레비시아이인 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 콜라닌산의 산가수분해 조건을 최적화하고, 콜라닌산 가수분해물을 기질로 사용하여 퓨코실화 올리고당을 생산하는 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 퓨코스는 6-디옥시헥소스 단당류로, 보통 박테리아, 식물, 인간을 포함한 살아있는 유기체에서 발견되는 희귀한 당이다. 퓨코스는 항노화, 항염증, 그리고 면역증진을 포함한 수많은 생리적 특성을 가지고 있다. 또한, 퓨코스는 프리바이오틱 효과로 주목받고 있는 푸코실화 올리고당(FOS)의 생합성 기질로 사용될 수 있다. 2'-퓨코실락토스(2'-FL)와 같은 FOS는 *salvage* 경로를 통해 퓨코스를 기질로 사용하여 엔지니어링된 효모 및 대장균에서 생산된 바 있다.

[0003] 이러한 퓨코스는 대장균이 생산하는 콜라닌산, 클렙시엘라 뉴모니에 I-1507이 생산하는 퓨코젤, 그리고 클라비박터 미치가넨시스가 생산하는 클라반과 같은 세포 외 다당류(EPS)의 구성 성분이기도 하다. 따라서, 퓨코스가 풍부한 EPS는 퓨코스를 생산하기 위한 공급원으로 사용될 수 있다. 그 중 대장균에 의해 생산되는 콜라닌산은 퓨코스, 갈락토스, 글루코스, 글루쿠론산이 2:2:1:1의 몰비율로 반복적인 단위로 구성되어 있다. 따라서, 콜라닌산에서 퓨코스의 비율은 약 31%로 높기 때문에 퓨코스를 생산하는 기질로서 큰 잠재력을 가지고 있다.

[0004] 이에 본 발명자들은 콜라닌산으로부터 퓨코스와 같은 기능성 당을 효율적으로 얻을 수 있는 산가수분해 조건을 최적화하였고, 이때 얻어진 콜라닌산 분해물을 기질로 이용하는 재조합 효모로부터 2'-퓨코실락토스(2'-FL)와 2'-퓨코실갈락토스(2'-FG)를 생산함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌**특허문헌**

[0005] (특허문헌 0001) 한국특허등록공보 KR 10-2568773 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 푸코실화 올리고당의 기질인 푸코스를 고수율로 얻기 위한 콜라닌산의 산가수분해 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 콜라닌산 산가수분해물을 기질로 사용하여 푸코실화 올리고당을 생산하기 위한 효율적 또는 생물학적 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 콜라닌산 가수분해물을 기질로 사용하여 푸코실화올리고당을 생산하는방법을 제공한다.
- [0009] 구체적으로, 본 발명은
- [0010] (1) 콜라닌산을 산가수분해하여 푸코스를 생산하는 단계; 및
- [0011] (2) 단계(1)에서 생산된 푸코스를 기질로 푸코실화올리고당을 생산하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 방법에서, 단계 (1)의 콜라닌산을 산가수분해하는 단계는 산의 종류 및 가수분해 조건에 따라 가수분해물의 종류 및 수율이 결정될 수 있고, 산은 강산 또는 약산을 사용할 수 있으나, 약산을 사용하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 인산을 사용하여 콜라닌산을 가수분해할 때, 푸코스 및 갈락토스를 각각 높은 수율로 얻을 수 있다.
- [0013] 구체적인 일실시예에서, 상기 단계 (1)의 산가수분해는 1 내지 8(% w/v) 약산을 사용하여, 50 내지 150℃에서 10 내지 100분간 수행될 수 있고, 바람직하게는 1 내지 6(% w/v)인산을 사용하여 100℃ 내지 130℃에서 15분 내지 90분간 수행될 수 있다. 상기 조건을 벗어난 범위에서는 콜라닌산의 가수분해가 거의 일어나지 않거나 과분해가 일어나 원하는 단당류의 가수분해물을 얻을 수 없다.
- [0014] 본 발명에서 "푸코실화 올리고당"은 푸코스 및 다른 당류의 결합으로 형성된 올리고당을 의미하며, 구체적으로, 푸코스와 함께 푸코실화올리고당을 생성할 수 있는 당류는 단당류이고, 바람직하게는 락토스 및 갈락토스이며, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 단계 (2)의 푸코실화 올리고당의 생산 단계는 단계 (1)에서 생성된 푸코스를 락토스와 함께 기질로 사용하고 하기 효소를 사용함으로써 푸코실화락토스를 생산하는 효율적 방법일 수 있다:
- [0016] (1) L-푸코카이네이스/5'-다이포스페이트-푸코스(GDP-푸코스)포스포릴레이스; 및
- [0017] (2) α -1,2-푸코실 전이효소.
- [0018] 또한, 상기 단계 (2)의 푸코실화 올리고당의 생산 단계는 단계 (1)에서 생성된 푸코스를 락토스와 함께 기질로 사용하고 상기 효소를 발현하는 미생물로부터 푸코실화락토스를 생산하는 생물학적 방법일 수 있다. 여기서, 상기 미생물은 사카로마이세스 세레비시아이일 수 있고, 상기 사카로마이세스 세레비시아이는 L-푸코카이네이스/5'-다이포스페이트-푸코스(GDP-푸코스)포스포릴레이스 및 α -1,2-푸코실 전이효소를 암호화하는 유전자 및 기질인 락토스를 흡수하기 위한 헥소스 수송체를 암호화하는 유전자가 도입된 재조합 사카로마이세스 세레비시아이일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 구체적인 다른 일 실시예에 따르면, 단계 (2)의 푸코실화 올리고당의 생산 단계는 단계 (1)에서 생성된 푸코스 및 갈락토스를 기질로 사용하고 하기 효소를 사용함으로써 푸코실화락토스를 생산하는 효율적 방법일 수 있다:
- [0020] (1) L-푸코카이네이스/5'-다이포스페이트-푸코스(GDP-푸코스)포스포릴레이스; 및
- [0021] (2) α -1,2-푸코실 전이효소.
- [0022] 또한, 상기 단계 (2)의 푸코실화 올리고당의 생산 단계는 단계 (1)에서 생성된 푸코스 및 갈락토스를 기질로 사용하고 상기 효소를 발현하는 미생물로부터 푸코실화갈락토스를 생산하는 생물학적 방법일 수 있다. 여기서, 상기 미생물은 사카로마이세스 세레비시아이일 수 있고, 상기 사카로마이세스 세레비시아이는 L-푸코카이네이스/5'-다이포스페이트-푸코스(GDP-푸코스)포스포릴레이스 및 α -1,2-푸코실 전이효소를 암호화하는 유전자가 도입

되고, 갈락토스를 대사할 수 있는 *GAL1* 유전자가 결실된 재조합 사카로마이세스 세레비시아이일 수 있다.

- [0023] 본 발명에서, 상기 L-퓨코카이네이스/5'-다이포스페이트-퓨코스(GDP-퓨코스)포스포릴레이스는 기질인 퓨코스를 GDP-퓨코스로 전환시키는 효소로, 박테로이드 후라길리스 9343로 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 본 발명에서 사용된 L-퓨코카이네이스/5'-다이포스페이트-퓨코스(GDP-퓨코스)포스포릴레이스는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 2로 표시된 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0024] 본 발명에서, α -1,2-퓨코실 전이효소는 락토스 또는 갈락토스와 같은 단당류에 퓨토스를 결합하는데 사용되는 효소로, 헬리코박터 파이로리로부터 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명에서 사용된 α -1,2-퓨코실 전이효소는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 효소를 암호화하는 유전자는 서열번호 4로 표시된 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 사용되는 사카로마이세스 세레비시아이는 락토스를 흡수하지 못하므로 락토스 섭취를 위한 수송체가 요구되며, 상기 수송체는 피키아 스티피티스 유래의 헥소스 수송체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 사용된 헥소스 수송체는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 수송체를 암호화하는 유전자는 서열번호 6으로 표시된 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0026] 상기 퓨코실화올리고당의 생성에 이용되는 효소(수송체 포함)들은 효소들의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩타이드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, 상기 효소들은 이를 암호화하는 핵산 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 효소들의 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 서열번호 1 내지 5 중 어느 하나로 표시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [0027] 상기 효소 및 수송체는 상기 효소 및 수송체를 암호화하는 염기서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.
- [0029] 본 발명에서 폴리펩타이드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율(예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 Proc. Natl Acad. Sci USA 85:2444-2448), 및 BLAST(BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med.(NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR 25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.
- [0030] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이중 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.
- [0031] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다.
- [0032] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션(transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입(transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자

을 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.

[0033] 본 발명의 방법에서, 단계 (1)의 콜라닌산의 산가수분해 단계와 단계 (2) 푸코실화올리고당을 생산하는 단계는 단일 공정으로 동시에 수행되거나, 공간적으로 분리되어 순차적으로 수행될 수 있다. 구체적으로, 단계 (1)에서, 단계 (2)에서 기질로 사용될 가수분해물을 분리, 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명은 콜라닌산이 푸코스 공급원으로 이용될 수 있다는 가능성을 제시했을 뿐만 아니라 콜라닌산으로부터 푸코스를 고수율로 얻을 수 있는 최적의 산가수분해 방법을 제공함으로써 이용하여 푸코실화락토스 및 푸코실화 갈락토스와 같은 기능성 푸코실화올리고당의 대량 생산에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 콜라닌산의 푸코스를 이용한 푸코실화 올리고당 생산 과정의 도식도이다.
 도 2는 다양한 가수분해 조건이 콜라닌산의 산가수분해에 미치는 영향을 확인한 결과이다.
 도 3은 약산의 종류에 따른 콜라닌산 가수분해 효과를 확인한 결과이다.
 도 4는 콜라닌산 가수분해물을 이용한 효모의 푸코실화락토스 생산을 확인한 결과이다.
 이다.
 도 5는 사카로미세스 세레비시아이 D452-2_2'-FL의 발효 프로파일을 나타낸 것이다.
 도 6은 콜라닌산 가수분해물을 이용한 재조합 대장균의 푸코실화갈락토스 생산을 확인한 결과이다.
 도 7은 재조합 대장균을 이용하여 생산된 푸코실화갈락토스의 GC/TOF-MS 크로마토그램 및 질량 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.
 도 8은 표준당 푸코스와 갈락토스를 이용한 재조합 효모의 푸코실화갈락토스의 생산을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
 도 9는 콜라닌산 가수분해물을 이용한 본 발명의 재조합 효모의 푸코실화갈락토스의 생산을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[실시예 1] 콜라닌산의 대량생산

[0038] 콜라닌산의 대량생산을 위해, 이전에 보고된 재조합 대장균 JM109(DE3) $\Delta waaF + rcsF$ 발효 방법이 사용되었다 (Yun et al., 2021). 20 g/L 글루코스, 10.62 g/L 제이인산나트륨, 3 g/L 인산칼륨, 0.5 g/L 염화나트륨, 2.63 g/L 트립톤, 0.24 g/L 황산마그네슘, 0.011 g/L 염화칼슘을 포함한 최적화 배지 300 mL에서 발효기를 이용하여 발효를 진행하였고, pH 7을 유지하면서 25° C, 200 rpm에서 48시간 동안 배양하였다.

[실시예 2] 콜라닌산의 정량

[0041] 이전에 보고된 방법을 사용하여 콜라닌산을 정량하였다(Han et al., 2021). 세포 배양액을 95° C에서 10분간 끓이고 냉각 후, 10,000 X g에서 30분간 원심분리한 후, 콜라닌산이 함유된 상등액을 3배 부피의 에탄올과 혼합하여 4° C에서 하룻밤 동안 보관하였다(Bluenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). 침전물은 10,000 X g에서 30분간 원심분리하여 채취한 후 얼음 위에서 에탄올을 완전히 건조하였다. 이렇게 얻은 콜라닌산을 증류수에 용해한 후 동결건조하여 -20° C에서 보관하였다. 콜라닌산의 농도(콜라닌산 mg/배양부피 L) 및 수율(콜라닌산 mg /건중량 [DCW] g)는 콜라닌산 내 글루쿠론산의 몰 함량을 기준으로 계산하였다. 글루쿠론산 농도를 측정하기 위해, 수용액 상태의 콜라닌산 1 mL를 95% 황산에 녹인 12.5 mM 소듐 테트라보레이트 5 mL와 혼합하고, 100° C에서 5분 동안 끓였다. 얼음 위에서 냉각한 후, 0.5 %(w/v) 수산화나트륨 용액에 1.5 g/L 하이드록시다이페닐 100 μ L를 첨

가한 후, 526nm에서 흡광도(OD_{526})를 측정하였다. CA의 농도와 수율을 계산하기 위해 재조합 대장균의 600nm에서 흡광도(OD_{600})와 건중량 사이의 표준 곡선을 준비하고, OD_{526} 과 다양한 농도의 글루쿠론산 사이의 선형 상관관계를 나타내는 표준 곡선을 준비하였다.

[실시예 3] 콜라닌산의 성분분석

동결 건조된 콜라닌산은 성분분석을 위해 분말화 한 후 증류수에 용해시켜 준비하였다. 퓨코스, 갈락토스, 글루코스 및 글루쿠론산을 포함하는 콜라닌산 가수분해물은 HPLC 분석을 사용하여 미국 국립 재생 에너지 연구소(NREL; Golden, CO, USA)의 실험실 분석 절차에 따라 분석하였다(Sluite et al., 2006; Sluite et al., 2008). HPLC(Agilent 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)는 굴절률(RI) 검출기(Agilent Technologies)와 Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하였다.

[실시예 4] 퓨코스가 함유된 가수분해물을 생산하기 위한 콜라닌산의 산가수분해

퓨코스 생산을 위한 온도, 인산 농도, 처리 시간 등 콜라닌산의 전처리 조건을 최적화하기 위해 콜라닌산에 다양한 인산 농도(1%~6%(w/v))를 처리하여 마이크로파 분해기(Milestone, Shelton, CT, USA)에서 가수분해를 진행하였다. 콜라닌산과 다양한 인산 농도의 혼합물을 100° C에서 130° C의 온도에서 15분 내지 90분 범위의 시간 동안 처리하였다. 가수분해물은 얼음 위에서 냉각하고 5M 수산화나트륨을 사용하여 pH 6으로 중화시킨 후 추가 분석하였다.

콜라닌산 가수분해물의 성분 중 퓨코스, 갈락토스, 글루코스는 HPLC로 분석하였고, 글루쿠론산 분석에는 Agilent 7890 B GC(Agilent Technologies)와 페가수스 HT-TOF-MS(LECO, St. Joseph, MI, USA)를 사용하였다. GC/TOF-MS 분석을 위해 가수분해물은 두 단계로 유도체화 하였다. 먼저, 가수분해물에 40 mg/mL의 메톡시아민 염산염-피리딘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 10 μ L 첨가하고 30° C에서 90분간 인큐베이션한 후, N-메틸-N-트리메틸-실릴-트리플루오로아세트아미드(Sigma-Aldrich) 45 μ L를 첨가하고 37° C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 유도체화된 시료(1 μ L)를 GC에 주입하고 RTX-5Si1 MS 컬럼(길이 30-m, 내경 0.25-mm, 막두께 0.25- μ m; Restek, Bellefonte, PA, USA)으로 분리하였다.

그 결과, 도 2 및 표 1에 나타나는 바와 같이, 퓨코스는 110° C에서 62.5%(이론적 최대치)로 수율이 가장 높았으므로, 산가수분해 온도는 110° C로 고정되었다. 다음으로 다양한 인산 농도에서 퓨코스의 가수분해 수율을 비교한 결과, 6%(w/v)에서 92.8%(이론적 최대치)였으며, 그 다음으로 4%(w/v)에서 88.5%이었지만, 퓨코스의 수율은 6%(w/v)에서 4%(w/v)에 비해 유의하게 높지는 않았다. 산가수분해에서 고농도의 산을 사용하면 강산과 같이 당당류를 HMF로 과분해시킬 수 있기 때문에(Roman-Leshkov et al., 2006) 인산 농도는 4%(w/v)로 고정하였다. 마지막으로, 다양한 처리 시간 중, 퓨코스의 가수분해 수율이 가장 높은 것은 60분일 때 88.5%(이론적 최대치)였으며, 가수분해 시간이 60분으로 늘어날 때까지 증가했지만, 처리시간을 60분에서 90분으로 늘렸을 때는 퓨코스의 수율이 증가하지 않았는데, 이는 60분이면 콜라닌산을 퓨코스로 가수분해할 수 있을 정도로 충분하다는 것을 의미한다. 또한, 산업의 경제적인 공정과 생산성을 고려할 때 짧은 가수분해 시간이 적합하다(Horn & Eijssink, 2010). 따라서, 콜라닌산의 산가수분해는 110° C, 4%(w/v) 인산 및 60분의 가수분해 조건을 선택하였다.

표 1

콜라닌산 가수분해물의 종류 및 다양한 가수분해 조건에서의 수율

Hydrolysis condition			^b Hydrolysis yield (% of theoretical max.)			
H ₃ PO ₄ (%, w/v)	Temp. (°C)	Time (min)	Fucose	Galactose	Glucose	Glucuronic acid
1.0	110	60	36.4 ± 6.3	57.6 ± 3.6	44.9 ± 3.7	22.0 ± 19.1
	110	90	44.3 ± 0.8	60.9 ± 0.2	47.6 ± 1.6	10.3 ± 1.4
	120	60	22.3 ± 1.8	38.6 ± 0.3	24.9 ± 2.9	11.9 ± 2.2
	130	60	12.3 ± 1.0	45.2 ± 0.5	35.4 ± 0.2	5.0 ± 0.1

2.0	100	60	32.3 ± 5.5	41.0 ± 6.9	54.6 ± 1.6	5.8 ± 0.7
	110	60	65.2 ± 3.5	57.8 ± 1.6	47.9 ± 0.9	7.9 ± 1.1
	110	90	74.6 ± 4.8	67.1 ± 0.5	22.4 ± 5.4	11.2 ± 0.5
	120	60	43.7 ± 6.0	50.2 ± 2.2	42.4 ± 2.0	8.2 ± 4.1
	130	60	13.9 ± 2.2	50.6 ± 1.0	38.5 ± 0.4	5.2 ± 0.0
4.0	100	60	59.7 ± 4.6	56.5 ± 3.8	56.4 ± 15.2	6.0 ± 0.5
	110	15	58.5 ± 6.7	55.4 ± 3.0	50.1 ± 13.9	5.5 ± 0.1
	110	30	74.6 ± 4.8	66.7 ± 3.0	81.0 ± 16.2	11.8 ± 3.3
	110	60	88.5 ± 1.3	62.2 ± 0.9	65.8 ± 4.0	7.4 ± 0.6
	110	90	87.2 ± 1.4	68.3 ± 0.3	74.0 ± 10.1	14.9 ± 11.2
	120	60	70.8 ± 9.2	64.2 ± 2.9	44.0 ± 2.1	18.5 ± 10.4
	130	60	15.9 ± 2.0	36.1 ± 1.4	39.2 ± 0.5	ND ^c
6.0	110	60	92.8 ± 1.0	69.3 ± 1.2	75.2 ± 10.3	42.8 ± 11.5

[0052] [실시예 5] 산 종류에 따른 콜라닌산 가수분해 효과

[0053] 콜라닌산의 산 가수분해시, 강산을 이용하는 경우 과분해에 의해서 원하는 수율로 퓨코스 등을 얻을 수 없으므로, 약산을 이용하였다. 추가로, 약산 중에서도 콜라닌산의 가수분해에 최적인 약산을 선택하기 위하여, 아세트산, 인산 및 포름산을 사용하여 실시예 4에서 결정된 최적 조건과 동일한 조건에서 콜라닌산의 산가수분해 반응을 수행하였다.

[0054] 그 결과, 도 3에 나타나는 바와 같이, 인산을 사용한 경우에 가수분해물 내 퓨코스 및 갈락토스 함량이 가장 높음을 확인하였고, 가수분해에 사용될 산을 인산으로 결정하였다.

[0056] [실시예 6] 2'-FL(퓨코실화락토스) 생산균주의 제작

[0057] 2'-FL을 생산하는 균주인 사카로미세스 세레비시아이 D452-2_2'-FL 균주는 3가지 유전자를 도입하여 제작하였다. 먼저, 박테로이드 후라길리스 9343의 L-퓨코카이네이스/5'-다이포스페이트-퓨코스(GDP-퓨코스) 포스포릴레이스를 코딩하는 *fkp*(M.J. Coyne, B. Reinap, M.M. Lee, L.E. Comstock, Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation, Science 307(5716) (2005) 1778-1781)와, 락토스와 GDP-퓨코스의 퓨코실화를 위한 헬리코박터 파이로리의 α-1,2-퓨코실 전이효소를 코딩하는 *fucT2*(G. Wang, P.G. Boulton, N.W.C. Chan, M.M. Palcic, D.E. Taylor, Novel *Helicobacter pylori* α1,2-fucosyltransferase, a key enzyme in the synthesis of Lewis antigens, Microbiology 145(11) (1999) 3245-3253.)와, 락토스 섭취를 위한 피키아 스티피티스의 핵소스 수송체를 코딩하는 돌연변이 HXT2.4(A291D)를 도입하였다. *fkp*, *fucT2* 및 돌연변이 HXT2.4(A291D) 세가지 유전자를 포함하는 각 플라스미드는 리튬 아세테이트/단일가닥 캐리어 DNA/폴리에틸렌 글리콜 방법(LiAc/SS carrier DNA/PEG method)을 사용하여 사카로미세스 세레비시아이 D452-2에 형질전환하였다 (도 1).

[0059] [실시예 7] 콜라닌산 가수분해물을 이용한 2'-FL의 생산

[0060] 사카로미세스 세레비시아이 D452-2_2'-FL 균주는 20 g/L 글루코스, 6.7 g/L 아미노산을 포함하지 않는 효모 질소원(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), 1.4 g/L 히스티딘, 류신, 유라실, 트립토판을 포함하지 않는 합성 효모 배지 첨가물(Sigma-Aldrich) 및 0.1 g/L 트립토판(Kanto Chemical Co., INC., Tokyo, Japan)을 포함한 배지를 사용하여 선택적 압력을 가하였다. 사전배양된 세포는 20 g/L 글루코스, 2 g/L 락토스, 1.6 g/L 퓨코스를 함유한 콜라닌산 가수분해물, 그리고 50 mM 수소화 칼륨 프탈산 버퍼(KHP 버퍼; pH 5.5)를 함유한 히스티딘, 류신, 유라실이 빠진 YSC 배지에서 발효를 진행하였다. 초기 OD₆₀₀은 0.1로 조절하였으며, 30° C, 200 rpm에서 105시간 동안 배양하였다(도 5).

[0062] [실시예 8] 2'-FG(퓨코실화갈락토스) 생산균주의 제작

[0063] 사카로미세스 세레비시아이에서 2'-FG 합성에 필요한 기질인 갈락토스를 이용하지 못하도록 하기 위해 갈락토스 대사의 첫 번째 단계에 관여하는 유전자 *GAL1*을 CRISPR-Cas9를 이용하여 삭제하였다. 가이드 RNA 플라스미드 p42K_gGAL1은 gRNA_GAL1_F 및 gRNA_GAL1_R의 프라이머 쌍(표 2, 3)과 함께 pRS42K 플라스미드를 사용하여 리버스 PCR을 통해 제작하였다. 또한 *GAL1*을 삭제하기 위한 공여 DNA는 프라이머 쌍 dDNA_GAL1_F와 dDNA_GAL1_R을 사용하여 제작하였다(표 2). 사카로미세스 세레비시아이 D452-2는 가이드 RNA인 p42K_gGAL1 2 µg과 20 µg의 공여 DNA 및 1 µg의 Cas9-NAT 플라스미드로 형질전환시켰다(표 1). *GAL1*의 삭제는 프라이머 쌍 Conf_GAL1_F 및 Conf_GAL1_R(표 1)를 사용하여 콜로니 PCR로 확인하였고, 결과적으로 컨트롤 균주인 사카로미세스 세레비시아이 D452-2 Δ GAL1 균주를 제작하였다. 효모에서 2'-FG 생산을 위해, D452-2 Δ GAL1 균주에 *fkp*와 *fucT2*를 각각 포함하는 플라스미드를 LiAc/SS 운반체 DNA/PEG법을 이용하여 넣어주었고, 최종적으로 사카로미세스 세레비시아이 D452-2_2'-FG 균주를 제작하였다(도 1).

[0065] [실시예 9] 콜라닌산 가수분해물을 이용한 2'-FG의 생산

[0066] 표준당을 사용하여 효모 사카로미세스 세레비시아이 D452-2_2'-FG에서 2'-FG를 생산하기 위해, 성장을 위한 탄소 공급원으로 20 g/L 글루코스를, 그리고 2'-FG 생산 기질로 2 g/L 퓨코스와 갈락토스를 넣은 YSC 배지에서 발효를 진행하였다. 이 때 발효 조건은 30° C, 200rpm이었다.

[0067] 그 다음으로, 퓨코스와 갈락토스의 공급원으로 콜라닌산 가수분해물을 사용하여 D452-2_2'-FG 균주에서 2'-FG를 생산하기 위해, 20 g/L 글루코스, 2.8 g/L 퓨코스와 2.3 g/L 갈락토스를 함유한 콜라닌산 가수분해물을 넣은 YSC 배지를 이용하여 30° C, 200rpm 조건에서 66시간 동안 발효를 진행하였다. 발효 시 UV 가시 분광 광도계(Bio-Rad)를 사용하여 OD₆₀₀을 측정해 세포 성장을 모니터링하였다.

[0069] [실시예 10] 가스 크로마토그래피/비행시간-질량분광법을 이용한 퓨코실화 올리고당 생산 분석

[0070] 2'-FL 및 2'-FG의 생산을 확인하기 위하여 GC/TOF-MS 분석을 실시하였으며, 배양액 1 mL를 95° C에서 5분간 끓이고, 상등액을 20,035 X g, 4° C에서 5분간 원심분리하여 얻었다. 상등액 20 µL를 진공 건조시킨 후 유도체화하였으며, 유도체화된 시료는 [실시예 4]에서 설명한 바와 같이 분석하였다. 퓨코스, 락토스, 갈락토스, 포도당 및 글루쿠론산의 농도 또한 [실시예 3]에 설명된 것과 동일한 방법을 사용하여 HPLC 또는 GC/TOF-MS로 측정하였다.

[0071] 그 결과, 사카로미세스 세레비시아이 D452-2_2'-FL 균주를 발효하여 2'-FL이 생산되는 것을 GC/TOF-MS로 확인하였다. 표준 2'-FL과 같은 머무름 시간에 생성된 피크와, 그 때 나타난 피크의 질량 스펙트럼 또한 표준 2'-FL의 질량 스펙트럼과 일치하였다. 이를 통해, 콜라닌산 분해물인 락토스 및 퓨코스를 기질로 사용하여 효모에서의 퓨코실화락토스가 생성됨을 확인하였다(도 4).

[0072] 또한, D452-2_2'-FG 균주를 먼저 표준 퓨코스와 갈락토스를 기질로 이용하여 발효한 후 위와 동일하게 GC/TOF-MS로 확인하였다(도 8). 정제된 2'-FG와 같은 머무름 시간에서 피크를 확인하고, 질량 스펙트럼이 일치하는 것을 확인하여 콜라닌산 가수분해물인 퓨코스 및 갈락토스를 기질로 이용하여 발효를 진행했을 때 퓨코실화갈락토스를 생산하는 것을 확인하였다(도 9).

[0074] [실시예 11] 겔 여과 크로마토그래피 및 고성능 액체 크로마토그래피를 통한 2'-FG의 생산 및 정제

[0075] 2'-FG는 표준물질이 존재하지 않기 때문에, 최초로 2'-FG를 생산하는 것으로 보고된 대장균 BL21(DE3) pmBCGWF를 이용하여 생산하였다(E.J. Yun, J.-J. Liu, J.W. Lee, S. Kwak, S. Yu, K.H. Kim, Y.-S. Jin, Biosynthetic routes for producing various fucosyl-oligosaccharides, ACS Synth. Biol. 8(2) (2019) 415-424.). 대장균 BL21(DE3) pmBCGWF는 1-L 플라스크에 50 µg/mL의 카나마이신이 함유된 LB 배지에 접종하고 37° C, 200 rpm에서 배양하였다. OD₆₀₀이 1.0에 도달하면 5 g/L 글리세롤, 2 g/L 갈락토스, 그리고 0.1 mM IPTG를 첨가하였다. 인큐베이션 온도는 IPTG 유도 후 25° C로 변경하고, 글리세롤이 고갈되면 4 g/L 글리세롤을 추가로 첨가하였다.

[0076] 대장균에서 생산된 2'-FG는 겔 여과 크로마토그래피인 Sephadex G-10 수지(Sigma-Aldrich)로 패키징된 컬럼(I.D. 6 X 100 cm)을 이용하여 1차로 정제하였다. 농축시킨 대장균 배양액을 컬럼에 주입하고 증류수를 이동상으로

하여 1 mL/min의 유량으로 용출되는 샘플을 받았다. 고순도 2'-FG를 얻기 위해 1차 정제 샘플을 HPLC를 이용하여 2'-FG가 검출되는 특정 시간에 샘플을 수집하여 2차 정제를 실시하였다(도 6 및 도 7).

표 2

Name	Sequence (5'→3', restriction sites are underlined)
Primer	
gRNA_GAL1_F (서열번호 7)	GGTGATGTACCAACTGGCAGGTTTTAGAAAGCTAGAAATAGCAAG
gRNA_GAL1_R (서열번호 8)	CTGCCAGTTGGTACATCACC CGATCTTTATCTTTCACCTGCG
dDNA_GAL1_F (서열번호 9)	TCA AAT GTC ATA AAA GTA TCA ACA AAA AAT TGT TAA TAT ACC TCT ATA CTT TAA CGT CAA <u>GGA GAA AAA ACT ATA</u> <u>GTA TAC TTC</u> <u>TTT TTT</u>
dDNA_GAL1_R (서열번호 10)	TAT TTT GTG ATG CTA AAG TTA TGA GTA GAA AAA AAT GAG AAG TTG TTC TGA ACA AAG TAA <u>AAA AAA GAA GTA TAC</u> <u>TAT AGT TTT</u> <u>TTC TCC</u>
Conf_GAL1_F (서열번호 11)	TGGAACCTTTCAGTAATACGC
Conf_GAL1_R (서열번호 12)	GTCATTTCTTTTCCTCCTCG

[0077]

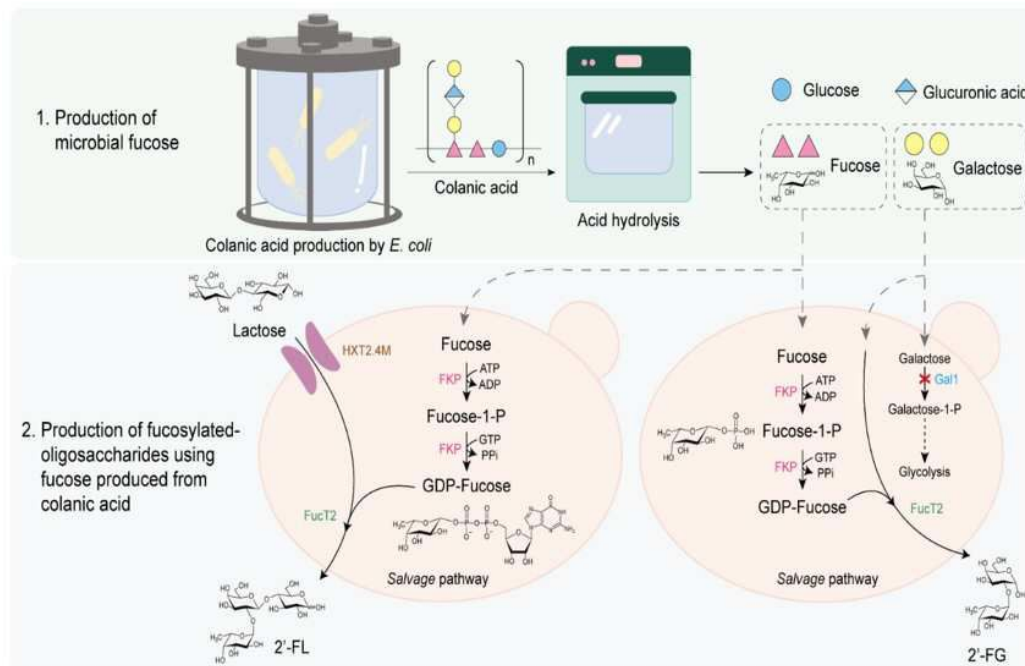
표 3

Name	Description
Plasmid	
pRS423GPD	<i>HIS3</i> , GPD promoter, <i>CYC1</i> terminator, 2 μ origin, and Amp ^r
pRS425GPD	<i>LEU2</i> , GPD promoter, <i>CYC1</i> terminator, 2 μ origin, and Amp ^r
pRS426GPD	<i>URA3</i> , GPD promoter, <i>CYC1</i> terminator, 2 μ origin, and Amp ^r
pRS423GPD_ <i>fucT2</i>	pRS423GPD harboring <i>fucT2</i> from <i>H. pylori</i>
pRS425GPD_ <i>fkp</i>	pRS423GPD harboring <i>fkp</i> from <i>B. fragilis</i> 9343
pRS426GPD_ <i>HXT2.4M</i>	pRS426GPD harboring mutant HXT2.4(A291D) from <i>S. stipitis</i>
pmBCGWF	Derived from pCOLAduet-1, P _{T7} - <i>manB</i> , <i>manC</i> -P _{T7} - <i>gmd</i> , <i>wcaG</i> -P _{T7} - <i>fucT2</i> -T ₇ , Kan ^r
pRS42K	2 μ origin, KanMX
p42K_ <i>gGAL1</i>	pRS42K, gRNA cassette targeting <i>GAL1</i>
Cas9-NAT	p414-TEF1p-Cas9-CYC1t-NAT1
Strain	
<i>S. cerevisiae</i> D452-2	<i>S. cerevisiae</i> , MAT α , <i>leu2</i> , <i>his3</i> , <i>ura3</i> , and <i>can1</i>
D452-2_2'-FL	<i>S. cerevisiae</i> D452-2 harboring pRS423GPD_ <i>fucT2</i> , pRS425GPD_ <i>fkp</i> , and pRS426GPD_ <i>HXT2.4M</i>
D452-2 Δ <i>GAL1</i>	Deletion of <i>GAL1</i> in <i>S. cerevisiae</i> D452-2
D452-2_2'-FG	<i>S. cerevisiae</i> D452-2 Δ <i>GAL1</i> harboring pRS423GPD_ <i>fucT2</i> , pRS425GPD_ <i>fkp</i> , pRS426GPD
<i>E. coli</i> JM109(DE3) Δ <i>waaF</i> + <i>rscF</i>	deletion of <i>waaF</i> and overexpression of <i>rscF</i> in <i>E. coli</i> JM109(DE3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F</i> ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pmBCGWF	BL21(DE3) harboring pmBCGWF plasmid

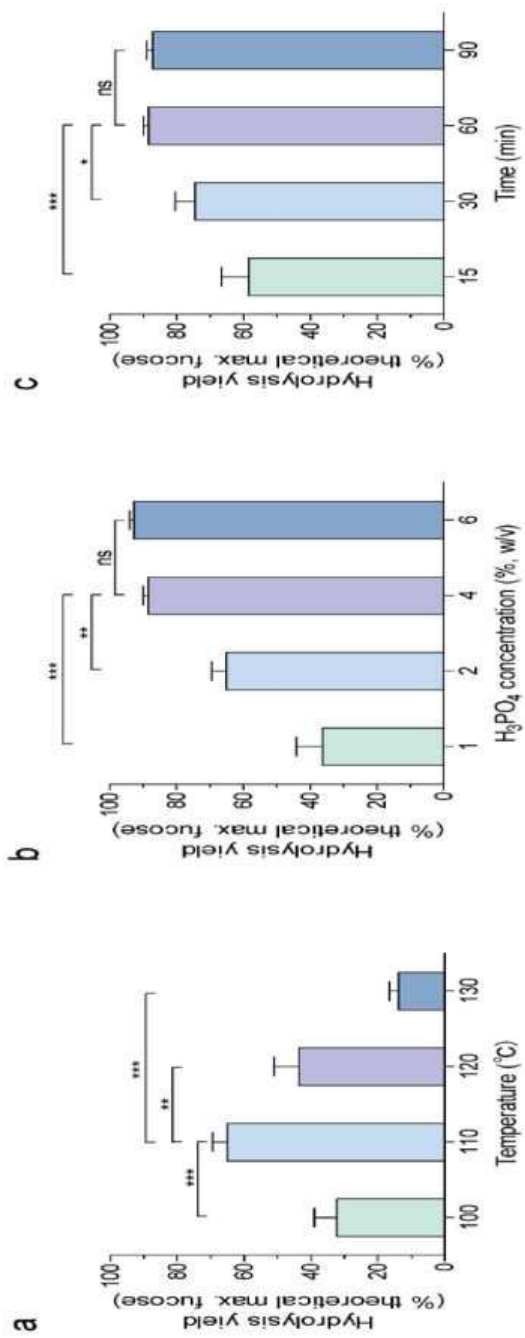
[0078]

도면

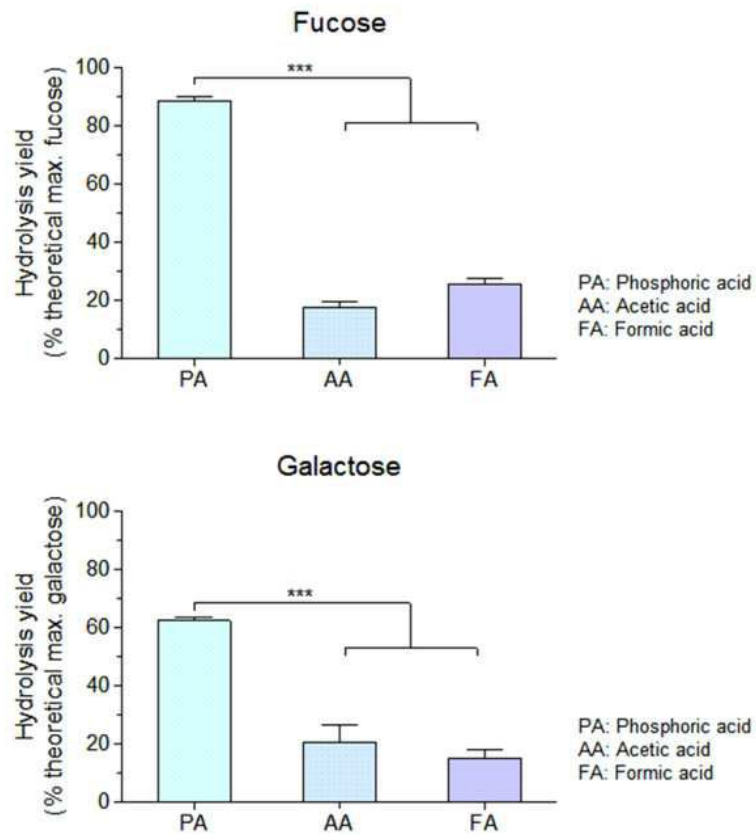
도면1



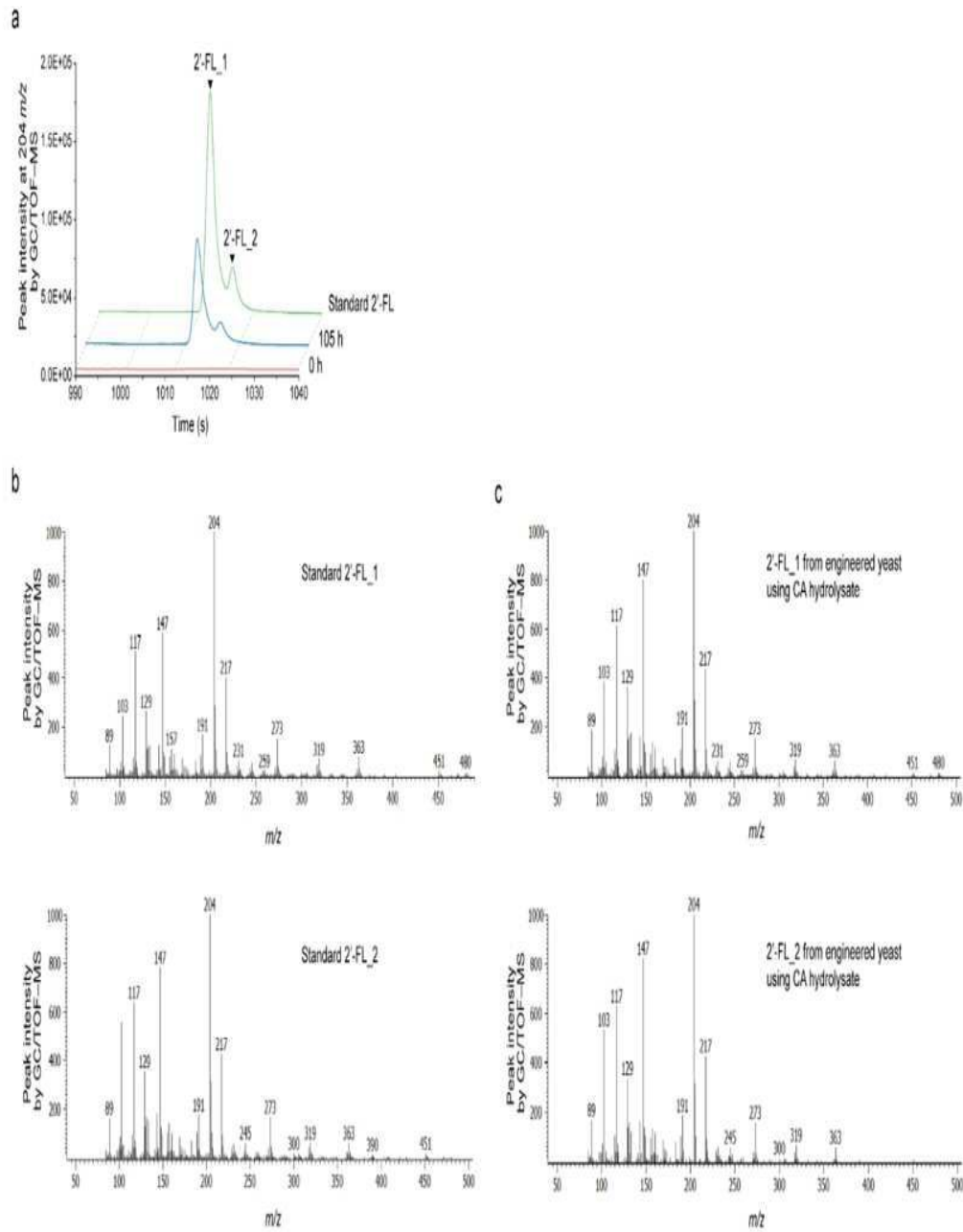
도면2



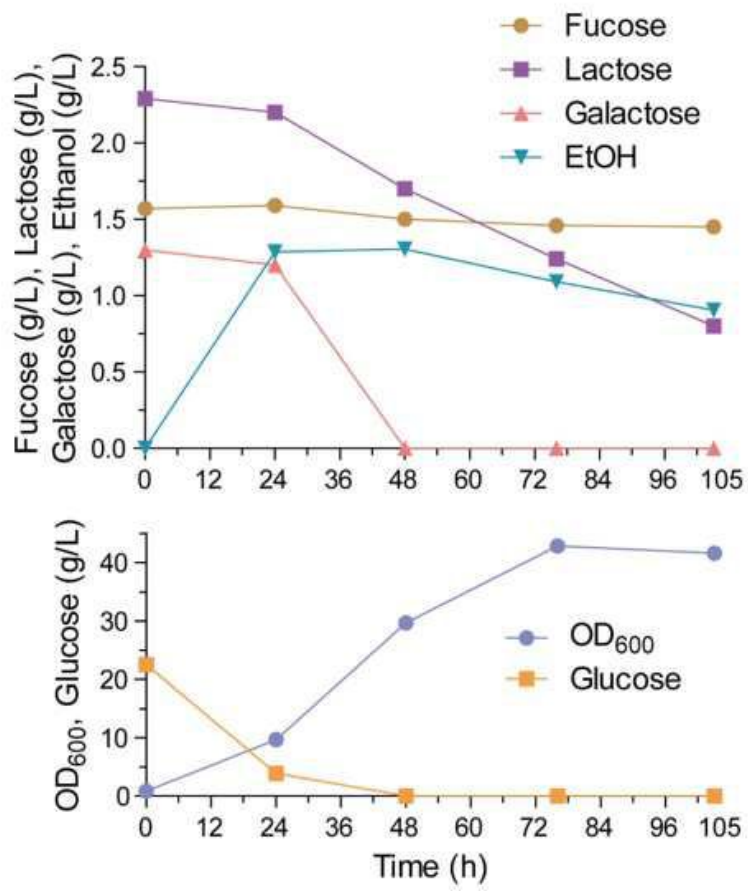
도면3



도면4

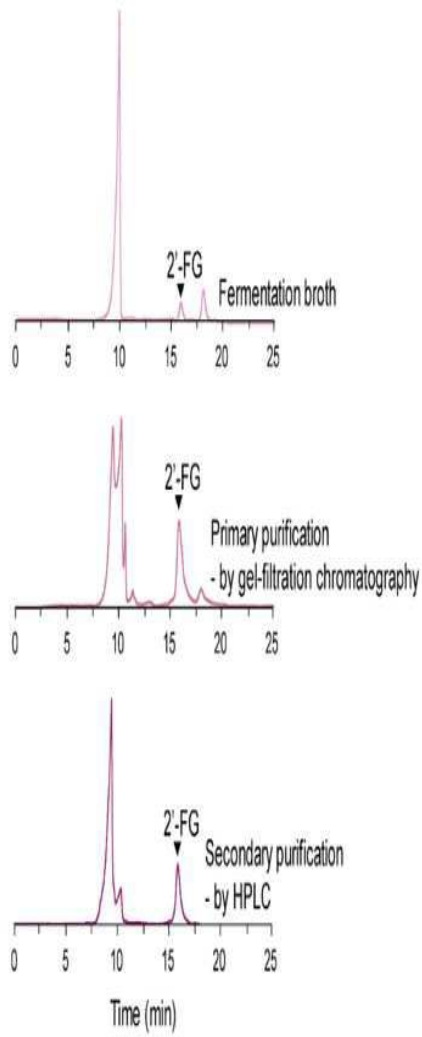


도면5

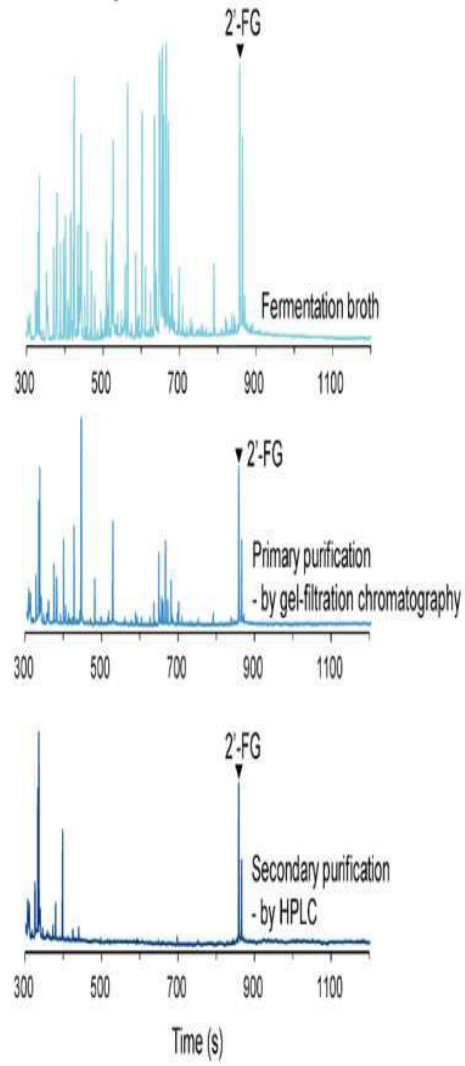


도면6

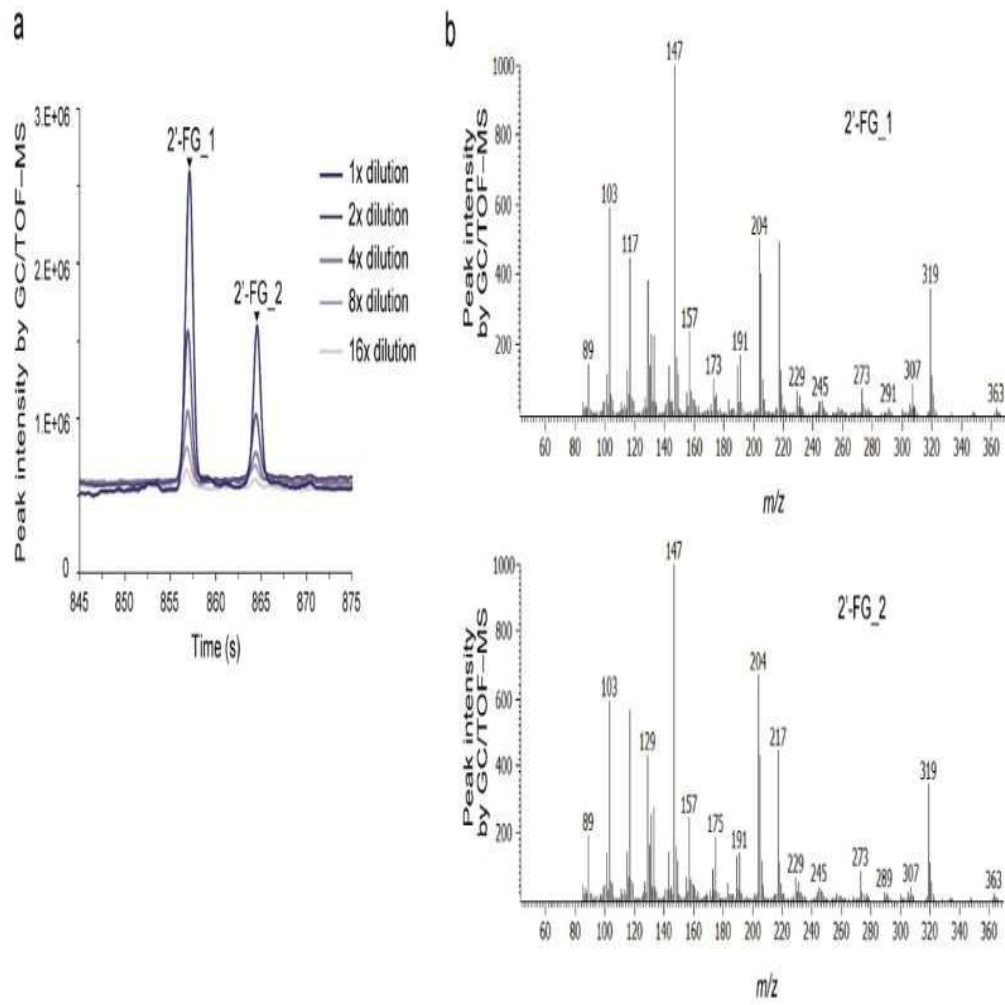
a HPLC Chromatograms



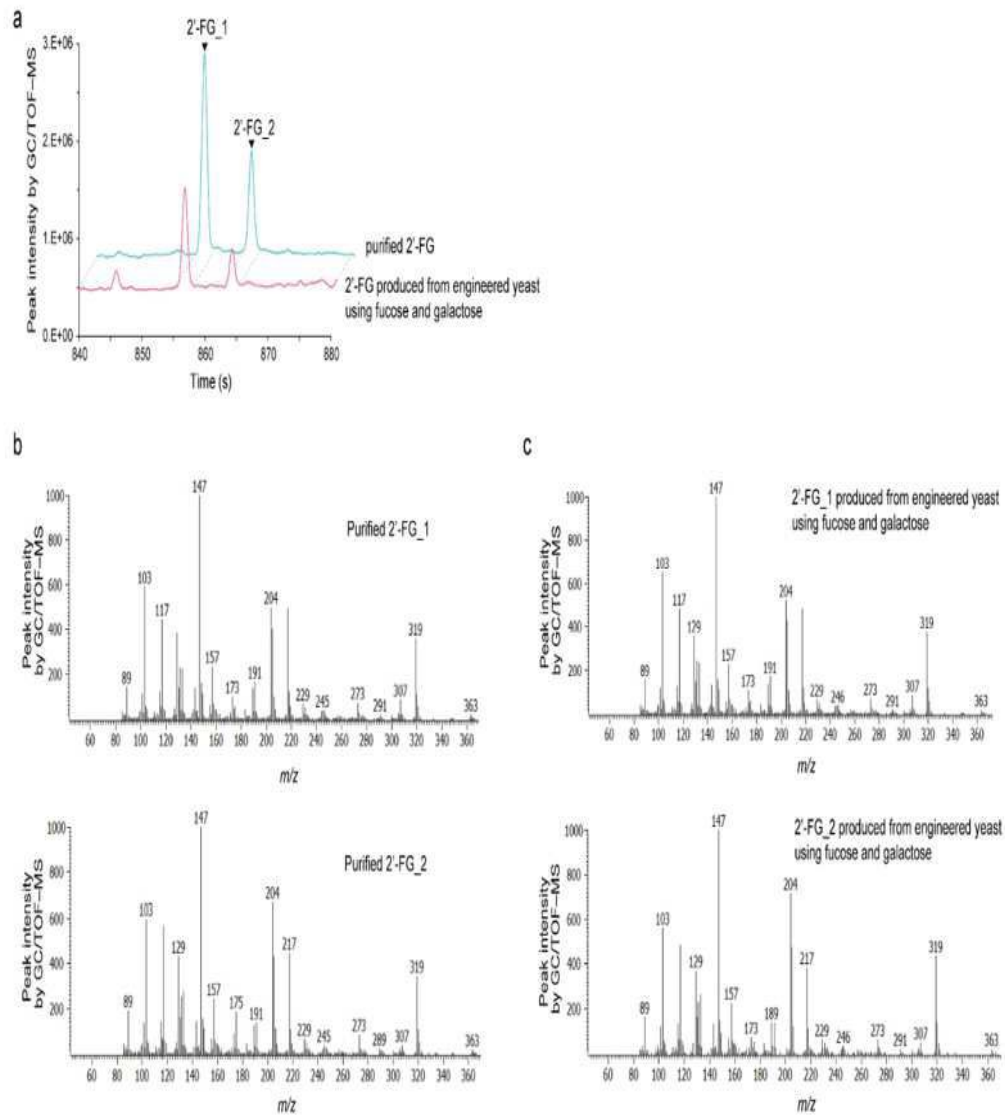
b GC Chromatograms



도면7



도면8



도면9

