



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월28일
(11) 등록번호 10-1953375
(24) 등록일자 2019년02월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7004 (2006.01) A23L 33/125 (2016.01)
A61K 31/7016 (2006.01) A61K 31/729 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) C12P 19/04 (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7004 (2013.01)
A23L 33/125 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2017-0154840
(22) 출원일자 2017년11월20일
심사청구일자 2017년11월20일
- (56) 선행기술조사문헌
US20120294840 A1
US20150231159 A1
US20150290261 A1
- (73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초4동 삼풍아파트 18동 805호
진용수
미국 일리노이주 61822 샴페인 샌드힐 레인 3005
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 11 항

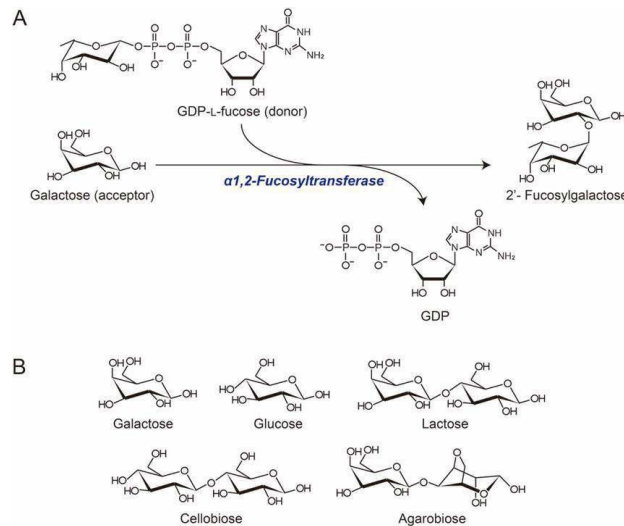
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 다양하고 신규한 푸코실 올리고당의 제조법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 다양하고 신규한 푸코실 올리고당의 제조법 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 GDP-L-푸코오스 도너와 다양한 당 수용체를 사용하여 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈와의 효소 반응을 통해 다양하고 신규한 푸코실 올리고당을 제조하고 이들의 프로바이오틱 특성을 규명하여 의학, 식품, 화장품 등의 소재로서의 용도를 제공하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/7016 (2013.01)
A61K 31/729 (2013.01)
A61K 8/602 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
C12N 9/1051 (2013.01)
C12P 19/04 (2013.01)
C12P 19/18 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/3202 (2013.01)

(72) 발명자

윤은주

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

유소라

경기도 남양주시 홍유릉로 156(이패동, 용마아파
 트)

이재원

미국 일리노이대학교 어바나 샴페인 과학대학 식품
 영양학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017005628

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원

연구과제명 식의약 소재용 퓨코스의 생물공학적 생산 플랫폼 구축

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

2'-퓨코실글루코오스, 2'-퓨코실갈락토오스, 2'-퓨코실셀로바이오스, 2'-퓨코실프룩토오스, 2'-퓨코실수크로오스, 2'-퓨코실말토오스, 2'-퓨코실만노오스, 2'-퓨코실자일로스 및 2'-퓨코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 퓨코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 장내 유익균의 증식을 촉진하고, 장내 유해균의 생육을 억제하는 것인, 프리바이오틱 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

장내 유익균은 비피도박테리움 속, 락토바실러스 속 또는 스트렙토코커스 속 균주인, 프리바이오틱 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

비피도박테리움 속 균주는 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697, 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082 또는 비피도박테리움 카시와노헨스(*Bifidobacterium kashiwanohence*) DSM 21854를 포함하는, 프리바이오틱 약학 조성물.

청구항 5

2'-퓨코실글루코오스, 2'-퓨코실갈락토오스, 2'-퓨코실셀로바이오스, 2'-퓨코실프룩토오스, 2'-퓨코실수크로오스, 2'-퓨코실말토오스, 2'-퓨코실만노오스, 2'-퓨코실자일로스 및 2'-퓨코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 퓨코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 화장료 조성물.

청구항 6

2'-퓨코실글루코오스, 2'-퓨코실갈락토오스, 2'-퓨코실셀로바이오스, 2'-퓨코실프룩토오스, 2'-퓨코실수크로오스, 2'-퓨코실말토오스, 2'-퓨코실만노오스, 2'-퓨코실자일로스 및 2'-퓨코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 퓨코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 식품 조성물.

청구항 7

당 수용체(sugar acceptor) 및 GDP-L-푸코오스(guanosine 5' -diphospho-β-L-fucose) 도너를 알파-1,2-퓨코실 트랜스퍼레이즈(α-1,2-fucosyltransferase)와 반응시켜 퓨코실 올리고당을 제조하는 것을 포함하고,

상기 당 수용체는 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이고,

상기 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈는 SEQ ID NOS: 1 내지 3의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 것인, 퓨코실 올리고당의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

반응은 20 내지 40℃에서 3 내지 24 시간 동안 수행하는 것인, 퓨코실 올리고당의 제조방법.

청구항 9

GDP-L-퓨코오스(guanosine 5'-diphospho-β-L-fucose) 도너 생산을 위한 디노보 경로(De novo pathway)에 관여하는 ManB, ManC, Gmd 및 WcaG를 발현하는 벡터; 및 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈(α-1,2-fucosyltransferase)를 발현하는 벡터가 도입된 재조합 대장균 또는 효모를 당 수용체(sugar acceptor) 및 글리세롤 하에서 배양하고, 대장균 배양물로부터 퓨코실 올리고당을 분리 정제하는 것을 포함하고,

상기 당 수용체는 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이고,

상기 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈는 SEQ ID NOS: 1 내지 3의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 것인, 퓨코실 올리고당의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

배양은 페드-배치 배양(Fed-batch culture)을 포함하는, 퓨코실 올리고당의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

페드-배치 배양은 25 내지 37℃에서 2 내지 60 시간 동안 수행하고, IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 추가하여 20 내지 30℃에서 60 내지 150 시간 동안 수행하는 것인, 퓨코실 올리고당의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GDP-L-퓨코오스 도너와 다양한 당 수용체를 사용하여 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈와의 효소 반응을 통해 다양하고 신규한 퓨코실 올리고당을 제조하는 방법 및 이의 프리바이오틱 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 프리바이오틱스는 장내 유익균에 의해 선택적으로 발효되어 장내 균총을 개선하고 인간의 건강에 유익한 물질들을 지칭한다. 최근에는 인간의 질병과 장내 균총과의 상관관계에 대한 연구들이 보고되면서 장내 균총은 제2의 인간게놈으로 인식되어 이 분야의 연구가 급속도로 발전하고 있다. 특히 장내 유익 균총 분포의 증가에 따라 비만, 당뇨 및 면역기능이 개선된다는 연구결과들이 발표되어 장내 균총 연구가 더욱 주목을 받고 있다.

- [0004] 푸코실 올리고당은 모두 올리고당 주성분 중 하나로서 프로바이오틱 미생물에 의해 선택적으로 발효되는 프리바이오틱 활성 및 병원성 미생물이 장내 정착하는 것을 예방하는 생리활성을 지니고 있다. 장 건강 관련 생리활성 외에도 푸코실 올리고당은 기억력을 강화시키는 것으로 알려져 있어 치매 예방에 도움이 될 것으로 예상하고 있다.
- [0005] 푸코실 올리고당 중에서도 이당체인 푸코실갈락토오스(FGal)을 뇌 신경세포인 해마 뉴런에 처리했을 때 신경세포의 성장을 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이는 FGal이 알츠하이머 또는 파킨슨병과 같이 신경계 관련 질환 치료제로 이용될 수 있는 가능성을 시사하는 것이다.
- [0006] 세계적으로 인구 고령화가 급속히 진행됨에 따라, 알츠하이머병, 파킨슨병과 같은 신경질환 환자가 급속히 증가하고 있으며, 이에 따라 효과적인 치료제 개발에 대한 수요가 커지고 있다. 그 예로, 세계 알츠하이머병 치료제 시장은 2023년까지 133억 달러 규모로, 파킨슨병 치료제 시장은 2022년까지 47억달러 규모로 확대될 전망이다. 하지만, 현재까지는 증상을 완화시키는 약물의 개발이 주를 이루어, 근본적인 치료제가 없는 상황으로 수요를 모두 충족시키지 못하는 상황이기 때문에, 잠재적인 시장이 매우 클 것으로 예상된다. 또한, 경제성장으로 인한 동남아시아 등의 제3세계의 구매력 확대는 향후 시장 성장 요인으로 작용될 전망이다.
- [0007] 앞서 기술한 다양한 푸코실 올리고당의 프리바이오틱 활성, 기억력 증진 및 신경세포 성장 촉진과 같은 생리활성은 푸코오스 유닛에서 기인할 것으로 예상되어 본 발명자들은 푸코실화 반응에 관여하는 핵심 효소인 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈 효소 반응을 이용하여 다양한 종류의 푸코실 올리고당을 제조하고 이들의 프리바이오틱스로서의 특성을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Rodriguez-Diaz et al (2013) Appl Environ Microbiol 79: 3847-3850
- (비특허문헌 0002) Kalovidouris et al (2005) J Am Chem Soc 127: 1340-1341
- (비특허문헌 0003) Bindels et al. (2015) Nat Rev Gastroenterol Hepatol 12(5):303-310
- (비특허문헌 0004) Kalovidouris et al (2005) J Am Chem Soc 127: 1340-1341

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 GDP-L-푸코오스 도너 및 다양한 당 수용체와 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈의 효소 반응을 통해 다양한 푸코실 올리고당을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 프리바이오틱 특성을 갖는 푸코실 올리고당의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 2'-푸코실글루코오스, 2'-푸코실갈락토오스, 2'-푸코실셀로바이오스, 2'-푸코실프루토오스, 2'-푸코실수크로오스, 2'-푸코실말토오스, 2'-푸코실만노오스, 2'-푸코실자일로스 및 2'-푸코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 푸코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 약학 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 2'-푸코실글루코오스, 2'-푸코실갈락토오스, 2'-푸코실셀로바이오스, 2'-푸코실프루토오스, 2'-푸코실수크로오스, 2'-푸코실말토오스, 2'-푸코실만노오스, 2'-푸코실자일로스 및 2'-푸코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 푸코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 화장료 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 2'-푸코실글루코오스, 2'-푸코실갈락토오스, 2'-푸코실셀로바이오스, 2'-푸코실프루토오스, 2'-푸코실수크로오스, 2'-푸코실말토오스, 2'-푸코실만노오스, 2'-푸코실자일로스 및 2'-푸코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 푸코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 당 수용체(sugar acceptor) 및 GDP-L-푸코오스(guanosine 5'-diphospho-β-L-fucose) 도너를

알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈(α -1,2-fucosyltransferase)와 반응시켜 퓨코실 올리고당을 제조하는 것을 포함하고,

[0017] 상기 당 수용체는 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이고,

[0018] 상기 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈는 SEQ ID NOS: 1 내지 3의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 것인, 퓨코실 올리고당의 제조방법을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 GDP-L-퓨코오스(guanosine 5'-diphospho- β -L-fucose) 도너 생산을 위한 디노보 경로(De novo pathway)에 관여하는 ManB, ManC, Gmd 및 Wca를 발현하는 벡터; 및 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈(α -1,2-fucosyltransferase)를 발현하는 벡터가 도입된 재조합 대장균 또는 효모를 당 수용체(sugar acceptor) 및 글리세롤 하에서 배양하고, 대장균 배양물로부터 퓨코실 올리고당을 분리 정제하는 것을 포함하고,

[0020] 상기 당 수용체는 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이고,

[0021] 상기 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈는 SEQ ID NOS: 1 내지 3의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 것인, 퓨코실 올리고당의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 GDP-L-퓨코오스 도너 및 다양한 당 수용체와 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈의 효소 반응을 이용하여, 상기의 효소 반응을 재조합 대장균에서 대사공학기법에 적용하여 퓨코실 올리고당을 생산하는 방법을 제공하는 효과가 있다.

[0024] 본 발명은 또한 퓨코실 올리고당의 프리바이오틱 특성을 기반으로 의학, 화장품, 식품 분야에서 프리바이오틱 소재로 사용하는 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈 효소반응을 통해 GDP-퓨코오스 도너와 다양한 당 수용체를 사용하여 다양한 종류의 퓨코실 올리고당을 생산한 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈와 다양한 당 수용체의 반응성 검사 결과이다.

도 3 내지 5는 GDP-L-퓨코오스 도너와, 당 수용체로 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스를 사용하여 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈와의 효소 반응을 통해 생산된 퓨코실 올리고당의 LC/MS 분석 결과이다.

도 6은 재조합 대장균을 이용하여 2-퓨코실갈락토오스 생산하는 모식도(A), 재조합 대장균의 배치 발효(B) 및 페드-배치 발효(C) 결과를 도시한 것이다.

도 7은 재조합 대장균의 발효액(A)에서 G-10 column을 이용하여 크기-배제 크로마토그래피를 통해 분리 정제된 2-퓨코실갈락토오스(B), 2-퓨코실갈락토오스의 알파-1,2-글리코시드결합을 확인하기 위해 2-퓨코실갈락토오스를 기질로 하여 알파-1,2-퓨코시데이즈의 효소 반응 결과(D)를 나타내며, 대조군으로 효소 코딩 유전자가 없는 빈 벡터를 포함하는 재조합 대장균의 조효소액의 알파-1,2-퓨코시데이즈의 효소 반응 결과(C)를 나타낸 것이다.

도 8은 비피도박테리움 속 균주에서 2-퓨코실갈락토오스의 프리바이오틱 활성을 확인한 결과이다.

도 9는 병원성 미생물에서 2-퓨코실갈락토오스의 대사를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명자들은 현재까지 화학적 합성법으로만 생산되었던 퓨코실갈락토오스(FGal)(미국특허 제7,858,578호)를 효소 반응 및 미생물 발효를 통해서 최초로 생산하였다. 또한, FGal은 프로바이오틱 미생물인 비피도박테리에 의해 발효되는 프리바이오틱임을 처음으로 입증하였다. 특히, 다양한 당 수용체 중에서 홍조류 주요 탄수화물인 아가로를 구성하는 이당체 기본 구조인 아가로바이오스를 사용하여 2-퓨코실아가로바이오스를 최초로 생산하였다. 아가로바이오스는 그 자체로도 항산화, 항균, 항염증, 항암 효과와 같은 생리활성 물질로 알려져 있으며 퓨코실화 반응을 통해 생산된 2-퓨코실아가로바이오스의 경우 신소재임과 동시에 다양한 생리활성이 기대되는

물질이다.

- [0028] 따라서, 본 발명은 2'-퓨코실글루코오스, 2'-퓨코실갈락토오스, 2'-퓨코실셀로바이오스, 2'-퓨코실프록토오스, 2'-퓨코실수크로오스, 2'-퓨코실말토오스, 2'-퓨코실만노오스, 2'-퓨코실자일로스 및 2'-퓨코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 퓨코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0029] 상기 퓨코실 올리고당은 장내 유익균의 증식을 촉진하고, 장내 유해균의 생육을 억제하며 병원성 미생물에 의해 대사되지 않는 프리바이오틱 활성을 가지고 있다. 또한, 살모넬라, 헬리코박터, 병원성 대장균, 노로바이러스 등의 점착 부위 또는 수용체 자리에 결합하여 병원성 균과 바이러스가 인체에 감염되어 증식하는 것을 예방할 수도 있다. 이중 2-퓨코실갈락토오스는 신경세포의 성장을 촉진하여 신경퇴행성 질환인 파킨슨병과 알츠하이머 치료제로 이용할 수 있고, 2-퓨코실아가로바이오스는 아가로바이오스의 자체의 항산화, 항균, 항염증, 항암 등의 특성을 통해 항산화제, 항균제, 항염증제, 항암제로도 사용 가능하다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697는 세포 내 퓨코시데이즈를 통해 2-퓨코실갈락토오스를 갈락토오스와 푸코오스로 분해하여 모두 이용하며, 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082는 세포 밖에서 2-퓨코실갈락토오스를 갈락토오스와 푸코오스로 분해한 후 갈락토오스만 이용한다. 또한, 요로감염증, 신생아 뇌막염, 패혈증을 유발하는 대장균(*E. coli*)과, 설사, 균혈증을 유발하는 살모넬라 엔테리카 세로바 티피무리움(*Salmonella enterica* serovar *typhimurium*)은 2-퓨코실갈락토오스를 대사하지 못하며 프로바이오틱 미생물에 의해서만 선택적으로 발효되는 프리바이오틱임을 알 수 있다.
- [0031] 상기 퓨코실 올리고당은 당 수용체 및 GDP-L-푸코오스(guanosine 5'-diphospho- β -L-fucose) 도너를 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈(α -1,2-fucosyltransferase)와 반응시켜 제조될 수 있다. 또는, GDP-L-푸코오스 생산을 위한 디노보 경로(De novo pathway)에 관여하는 ManB, ManC, Gmd 및 WcaG를 발현하는 벡터; 및 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈를 발현하는 벡터가 도입된 재조합 대장균 또는 효모를 각각 당 수용체와 글리세롤 하에서 배양시켜 배양물로부터 퓨코실 올리고당을 분리 정제하여 얻을 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어 "장내 유익균"은 "프로바이오틱스"와 동일한 의미로 섭취되어 장에 도달하였을 때 장내 환경에 유익한 작용을 하는 균주를 의미하며, 위산과 담즙산에서 살아남아 소장까지 도달하여 장에서 증식하고 정착하며, 장관 내에서 유용한 효과를 나타내고, 독성이 없으며 비병원성인 조건을 만족하는 균을 의미한다. 예컨대, 락토바실러스 속(*Lactobacillus*), 락토코커스 속(*Lactococcus*), 엔테로코커스 속(*Enterococcus*), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus*) 및 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium*)을 포함한다. 구체적으로, 상기 장내 유익균은 비피도박테리움 속, 락토바실러스 속 또는 스트렙토코커스 속 균주이고, 보다 구체적으로, 비피도박테리움 속 또는 스트렙토코커스 속 균주이다. 보다 더 구체적으로, 본 발명의 비피도박테리움 속 균주는 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697, 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082 또는 비피도박테리움 카시와노헨스(*Bifidobacterium kashiwanohence*) DSM 21854를 포함한다. 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*)를 포함하고, 스트렙토코커스 속 균주는 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*)를 포함한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 "장내 유해균"은 섭취되어 장에 도달하였을 때 장내 환경에 유해한 작용을 하는 균주를 의미한다. 예컨대, 슈도모나스 에루지노사 속(*Pseudomonas-aeruginosa*), 비브리오 속(*Vibrio*), 스태필로코커스 속(*staphylococcus*), 클로스트리디움 속(*Clostridiumperfringens*), 유박테리움 속(*Eubacterium*), 박테로이드 속(*Bacteroides*) 균주 및 황환원균(*sulfate reducers*)을 포함한다. 구체적으로, 상기 장내 유해균은 클로스트리디움 속, 유박테리움 속 또는 박테로이드 속 균주이다. 더 구체적으로, 클로스트리디움 속 균주는 클로스트리디움 디피실리(*Clostridium difficile*) 또는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)를 포함한다. 유박테리움 속 균주는 유박테리움 리모숨(*Eubacterium limosum*)을 포함하고, 박테로이드 속 균주는 박테로이드 후라길리스(*Bacteroides fragilis*)를 포함한다.
- [0034] 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이온아트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카

르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

- [0036] 또한, 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 한 양태로서, 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.
- [0038] 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.
- [0039] 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴(Amylopectin), 셀룰로오스(Cellulose) 또는 젤라틴(Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트(Dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산 마그네슘(Magnesium stearate), 스테아르산 칼슘(Calcium stearate), 스테아릴 푸마르산 나트륨(Sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스(Polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다.
- [0040] 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.
- [0041] 상기 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 구강용 스프레이제, 구강용 세정제, 치약제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.
- [0042] 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0043] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 상기 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 다른 시기에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 프리바이오틱 약학 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 프리바이오틱 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.
- [0047] 상기 비경구 투여하는 방법으로는, 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 프리바이오틱 약학 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이들에 제한되지 아니한다.
- [0048] 본 발명의 프리바이오틱 약학 조성물은 바람직하게는 경구 투여되거나 주사 투여될 수 있다.

- [0050] 본 발명은 또한 2'-퓨코실글루코오스, 2'-퓨코실갈락토오스, 2'-퓨코실셀로바이오스, 2'-퓨코실프루토오스, 2'-퓨코실수크로오스, 2'-퓨코실말토오스, 2'-퓨코실만노오스, 2'-퓨코실자일로스 및 2'-퓨코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 퓨코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0051] 퓨코오스를 함유하는 올리고당은 피부 표피층을 두껍게 하여 주름을 완화시키는 기능을 나타낼 수 있다. 따라서, 피부 투과율과 흡수율을 고려하였을 때 퓨코실 올리고당은 우수한 주름 개선 활성을 나타낼 수 있다. 이중 2'-퓨코실아가로바이오스는 아가로바이오스 자체의 항산화, 항균 활성 등을 통해 아토피, 여드름, 비듬 등을 억제 또는 치료하는데 효과적으로 사용이 가능하다.
- [0052] 본 발명의 화장품은 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 피리독신, 엽산피리독신, 비타민 B12, 판토텐산, 니코틴산, 니코틴산아미드, 엽산, 비타민 C, 비타민 H 등의 수용성 비타민; 비타민 A, 카로틴, 비타민 D2, 비타민 D3, 비타민 E(d1-알파 토크페롤, d-알파 토크페롤, d-알파 토크페롤) 등의 유용성 비타민; 콜라겐, 가수 분해 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴, 가수 분해 엘라스틴, 케라틴 등의 고분자 펩타이드; 히드록시에틸셀룰로오스, 크산탄검, 히알루론산나트륨, 콘드로이틴 황산 또는 그 염(나트륨염 등) 등의 고분자 다당; 세라미드, 피토스핑고신, 스펅고당지질 등의 스펅고 지질; 또는 갈조 엑기스, 홍조 엑기스, 녹조 엑기스 등의 해조 추출물을 포함한다.
- [0053] 본 발명의 화장품에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장품에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다. 이외에 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지성분, 보습제, 에멀리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알코올, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다. 유지 성분으로서는 에스테르계 유지, 탄화수소계 유지, 실리콘계 유지, 불소계 유지, 동물 유지, 식물 유지 등을 들 수 있다.
- [0054] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하다.
- [0055] 본 발명의 화장품은 용액, 유화물, 점성형 혼합물 등의 형상을 취할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함한다.
- [0057] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 밀크 로션, 아스트린젠트, 로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 헤어로션, 헤어토닉, 헤어에센스, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어트리트먼트, 바디로션 및 바디클렌저의 제형을 포함한다.
- [0059] 본 발명은 또한 2'-퓨코실글루코오스, 2'-퓨코실갈락토오스, 2'-퓨코실셀로바이오스, 2'-퓨코실프루토오스, 2'-퓨코실수크로오스, 2'-퓨코실말토오스, 2'-퓨코실만노오스, 2'-퓨코실자일로스 및 2'-퓨코실아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 퓨코실 올리고당을 포함하는 프리바이오틱 식품 조성물을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품, 식품 첨가제 또는 식이보조제로 사용될 수 있다.
- [0061] 상기 퓨코실 올리고당이 식품 첨가제로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0062] 또한, 퓨코실 올리고당의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있음은 물론이며, 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95 중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 0.1~80 중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 복용의 효율성이 떨어질 수 있으며, 95 중량%를 초과할 경우에는 제형화에 어려움이 있을 수 있다.
- [0063] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 퓨코실 올리고당은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0064] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 퓨코실 올리고당을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙

농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

- [0065] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~10 중량%, 바람직하게는 0.01~0.1 중량%로 포함된다.
- [0066] 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있으며, 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~0.1 중량% 범위 내로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0067] 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우, 본 발명의 식품 조성물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 장기간 복용이 가능하다.
- [0069] 본 발명은 또한 당 수용체(sugar acceptor) 및 GDP-L-푸코오스(guanosine 5'-diphospho-β-L-fucose) 도너를 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈(α-1,2-fucosyltransferase)와 반응시켜 푸코실 올리고당을 제조하는 것을 포함하고,
- [0070] 상기 당 수용체는 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이고,
- [0071] 상기 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈는 SEQ ID NOS: 1 내지 3의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 것인, 푸코실 올리고당의 제조방법을 제공한다.
- [0072] 종래의 푸코실 올리고당의 제조법으로, 2-푸코실갈락토오스의 화학적 합성법이 알려져 있으나, 이 방법은 합성 단계가 복잡하고 피리딘, 아세트산, 디클로로메탄, 톨루엔 등의 유기용매를 사용하며, 많은 단계를 거쳐도 2-푸코실갈락토오스가 아닌 유도체화된 형태로만 합성이 가능하였다(Kalovidouris SA *et al.* *J Ame Chem Soc* 127:1340-1341(2005)).
- [0073] 그러나, 본 발명의 푸코실 올리고당의 제조방법은 당 수용체와 GDP-L-푸코오스 도너를 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈와 효소 반응시켜 유도체화된 형태가 아닌 푸코실 올리고당의 생산이 가능한 것을 특징으로 한다. 또한, 다양한 당 수용체를 사용하여 다양한 종류의 푸코실 올리고당의 생산이 가능하다(도 1 참조).
- [0074] 상기 당 수용체는 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0075] 상기 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 박테로이드 프라질리스(*Bacteroides fragilis*), 또는 대장균(*E. coli*) 0126 등에서 유래된 것으로, 구체적으로, SEQ ID NOS: 1 내지 3의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈는 당 수용체의 종류에 따라 반응성에 차이가 있었다. 예컨대, 박테로이드 프라질리스(*Bacteroides fragilis*) 유래의 WcfB 효소는 셀로바이오스, 갈락토오스, 글루코오스에 대해 높은 활성을 나타냈고, 대장균(*E. coli*) 0126 유래의 WbgL 효소는 락토오스와 갈락토오스에 대해 높은 활성을 나타내며, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 유래의 FucT2 효소는 셀로바이오스와 갈락토오스에 대해 높은 활성을 나타낸다.
- [0077] 상기 당 수용체 및 GDP-L-푸코오스 도너와 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈의 효소 반응은 20 내지 40℃에서 3 내지 24 시간 동안, 더 구체적으로 25 내지 35℃에서 6 내지 12 시간 동안 수행할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 푸코실 올리고당의 제조방법을 통해 제조된 푸코실 올리고당은 2'-푸코실글루코오스, 2'-푸코실갈락토오스, 2'-푸코실셀로바이오스, 2'-푸코실락토오스, 2'-푸코실프룩토오스, 2'-푸코실수크로오스, 2'-푸코실말토오스, 2'-푸코실만노오스, 2'-푸코실자일로스 또는 2'-푸코실아가로바이오스일 수 있다.
- [0080] 또한, 본 발명은 GDP-L-푸코오스(guanosine 5'-diphospho-β-L-fucose) 도너 생산을 위한 디노보 경로(De

novo pathway)에 관여하는 ManB, ManC, Gmd 및 WcaG를 발현하는 벡터; 및 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈(α -1,2-fucosyltransferase)를 발현하는 벡터가 도입된 재조합 대장균 또는 효모를 당 수용체(sugar acceptor) 및 글리세롤 하에서 배양하고, 대장균 배양물로부터 퓨코실 올리고당을 분리 정제하는 것을 포함하고,

- [0081] 상기 당 수용체는 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이고,
- [0082] 상기 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈는 SEQ ID NOS: 1 내지 3의 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 것인, 퓨코실 올리고당의 제조방법을 제공한다.
- [0083] 종래의 미생물 대사공학기법을 도입하여 발효를 통해 퓨코실 올리고당인 2-퓨코실락토오스를 생산하는 방법은 헬리코박터 유래의 퓨코실트랜스퍼레이즈를 사용하여 락토오스로부터 2-퓨코실락토오스를 생산하나, 다양한 퓨코실 올리고당은 생산하지 못하는 단점이 있다.
- [0084] 반면, 본 발명의 퓨코실 올리고당의 제조방법은 미생물 대사공학기법을 도입한 미생물의 발효를 통해 다양한 종류의 퓨코실 올리고당을 제조할 수 있으며, 이를 위해, 당 수용체로 사용하는 물질의 대사경로가 결실된 대장균 또는 효모를 숙주로 사용하고, 디노보 경로를 숙주 내에 도입하여 도너인 GDP-1-푸코오스를 생산하며, 당 물질을 수용체로 공급하고, 탄소원으로 글리세롤을 사용하며, 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈를 도입하여 발효를 통해 퓨코실 올리고당을 생산할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은
- [0085] 도너인 GDP-L-푸코오스(guanosine 5'-diphospho- β -L-fucose)를 대장균 내에서 생산하기 위한 디노보 경로(De novo pathway)에 관여하는 ManB, ManC, Gmd 및 WcaG를 발현하는 벡터와,
- [0086] 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈(α -1,2-fucosyltransferase)를 발현하는 벡터를 제조하는 단계;
- [0087] 상기 벡터들을 당 수용체로 사용하는 물질의 대사경로가 결실된 대장균 또는 효모에 도입하여 형질전환시키는 단계;
- [0088] 형질전환된 대장균 또는 효모를 글리세롤을 탄소원으로 사용하고, 당 수용체 하에서 배양하는 단계; 및
- [0089] 배양물로부터 퓨코실 올리고당을 분리 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0090] 상기 GDP-L-푸코오스를 생산하는 디노보 경로는 프룩토오스 6P를 시작물질로 하여 만노오스-6-포스페이트 이소머레이즈(mannose-6-phosphate isomerase, ManM), 포스포만노뮤테이즈(phosphomannomutase, ManB), 만노오스-1-포스페이트 구아노실트랜스퍼레이즈(mannose-1-phosphate guanosyltransferase, ManC), GDP-만노오스-4,6-디하이드라테이즈(GDP-mannose-4,6-dehydratase, Gmd) 및 GDP-L-푸코오스 신테이즈(GDP-L-fucose synthase, WcaG) 효소를 이용하여 중간 산물로 순차적으로 만노오스 6P(mannose 6P), 만노오스 1P(mannose 1P), GDP-D-만노오스(GDP-D-mannose), GPD-4-케토-6-디옥시만노오스(GDP-4-keto-6-deoxymannose)를 거쳐 GDP-L-푸코오스를 생산하는 경로이다.
- [0091] 형질전환된 대장균의 배양은 페드-배치 배양(Fed-batch culture)을 포함할 수 있다.
- [0092] 상기 페드-배치 배양은 25 내지 37℃에서 2 내지 60 시간 동안 수행하고, IPTG(Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)를 추가하여 20 내지 30℃에서 60 내지 150 시간 동안 수행하는 것일 수 있다.
- [0093] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0095] <실시예 1> 퓨코실 올리고당의 합성
- [0096] 다양한 퓨코실 올리고당을 생산하기 위해 GDP-푸코오스 도너 및 다양한 당 수용체 조건에서 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈의 효소 반응을 수행하였다(도 1).
- [0097] 상기 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈 효소로, 대장균(*E. coli*) 유래 WbgL(GenBank: ABE98421.1), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 유래의 FucT2(GenBank: AAC99764.1) 및 장내 세균인 박테로이드 프라질리스(*Bacteroides fragilis*) 유래의 WcfB(GenBank: AAD40713.1)를 사용하였다. 각 효소 코딩 유전자를 함유한 pET21a 플라스미드 벡터를 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) star에 형질전환시켰다. 각각의 재조합 대장균을 37℃, 250 rpm 조건에서 OD 0.5까지 배양한 후, 0.1 mM의 IPTG를 이용하여 16℃, 250 rpm에서 18시간동안 효소 발현을 유도하였다.
- [0098] 도 1은 알파-1,2-퓨코실트랜스퍼레이즈 효소반응을 통해 GDP-푸코오스 도너와 다양한 당 수용체를 사용하여 다

양한 종류의 푸코실 올리고당을 생산한 모식도를 나타낸 것으로, 당 수용체로 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스를 사용하여 반응성에 대해 실험하였다.

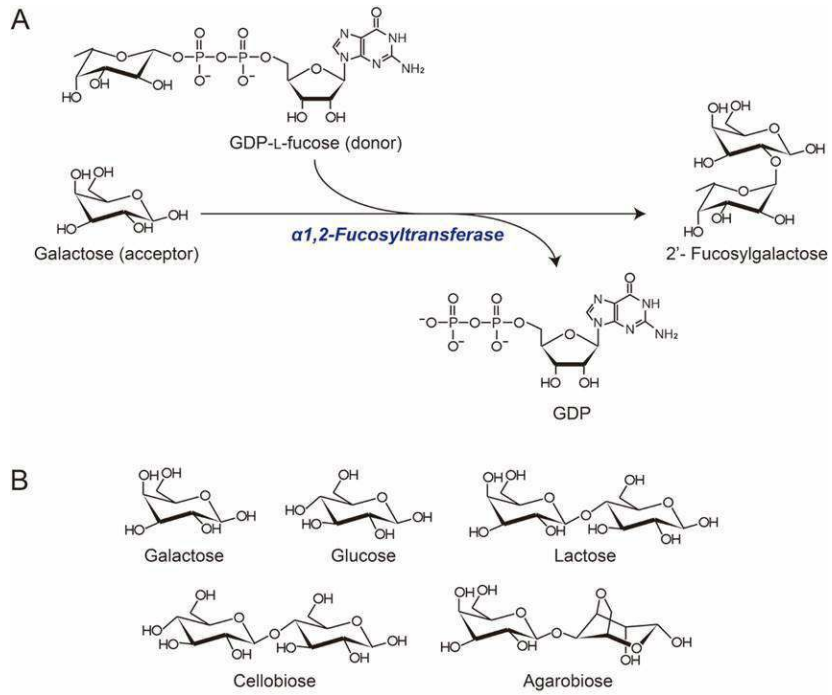
- [0099] 아가로바이오스를 제조하기 위해 아가로의 산 가수분해를 실시하였다. 10% (w/w) 아가로를 2% 인산을 사용하여 90℃에서 3시간 동안 산 가수분해 반응을 실시하였다. 산 가수분해 후 반응액에 수산화칼슘을 첨가하여 중화 및 인산을 제거하였다.
- [0100] 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈와 다양한 당 수용체의 효소 반응성 실험은 다음과 같이 수행하였다. 2 mM의 GDP-푸코오스 도너, 5 mM의 각각의 당 수용체, 1 mM의 1,4-Dithiothreitol(DTT), 50 mM 의 Tris-HCl(pH 7.0)과 5 mg/mL 농도의 WbgL, FucT2 또는 WcfB를 발현시킨 대장균의 세포내 조효소액을 30℃, 600 rpm 조건에서 12시간 반응시켰다.
- [0101] 도 2에 나타난 바와 같이, 박테로이드 프라질리스(*Bacteroides fragilis*) 유래의 WcfB 효소는 셀로바이오스, 갈락토오스, 글루코오스에 대해 높은 활성을 나타냈고, 대장균(*E. coli*) O126 유래의 WbgL 효소는 락토오스와 갈락토오스에 대해 높은 활성을 나타내며, 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 유래의 FucT2 효소는 셀로바이오스와 갈락토오스에 대해 높은 활성을 나타냈다.
- [0103] <실시예 2> 다양한 당 수용체에 대한 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈의 효소 반응
- [0104] 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈인 WbgL의 효소반응을 이용하여 GDP-푸코오스 도너와 갈락토오스 또는 글루코오스를 수용체로 사용하여 푸코실 올리고당을 생산하였다. 효소 반응에 사용한 당 수용체는 글루코오스, 갈락토오스, 셀로바이오스, 락토오스, 프룩토오스, 수크로오스, 말토오스, 만노오스, 자일로스 및 아가로바이오스였다. 효소 반응 조건은 각각의 재조합 대장균의 세포 내 조효소액 1 mg/mL, 0.2 mM GDP-푸코오스 도너, 0.5 mM 당 수용체 및 20 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 6.0)를 사용하여 30℃에서 12시간 동안 효소 반응을 수행하였다. 반응 산물은 LC/MS 분석을 통해 exact mass 값을 확인하였다. LC/MS 분석에는 Thermo Hypercarb porous graphitic carbon LC column(Thermo Fisher Scientific) 컬럼을 사용하였고, positive ion mode를 이용하였다. 이동상으로는 이동상A, 25 μ M 염화리튬 용액과 이동상B, 100% 아세트나이트릴 용액 두 가지를 41분 동안 0에서 80%까지 구배를 주며 0.2 mL/min의 속도로 흘려주었다. 이때 컬럼 온도는 70℃로 유지하였다. Source-dependent parameters는 다음과 같았다: nebulizing gas flow, 1.5 L/min; interface voltage, 4.5 kV; detector voltage, 1.65 kV; a curved desolvation line(CDL) temperature, 200℃; 및 heat block temperature, 200℃. MS 분석은 100에서 700 m/z 범위로 실시하였다.
- [0105] 도 3 내지 5에 나타난 바와 같이, 각각의 당 수용체에 대해 2'-푸코실글루코오스, 2'-푸코실갈락토오스, 2'-푸코실셀로바이오스, 2'-푸코실락토오스, 2'-푸코실프룩토오스, 2'-푸코실수크로오스, 2'-푸코실말토오스, 2'-푸코실만노오스, 2'-푸코실자일로스 및 2'-푸코실아가로바이오스가 생성되었음을 확인하였다.
- [0107] <실시예 3> 대사공학기법을 이용한 푸코실갈락토오스의 생산
- [0108] 재조합 대장균으로부터 생리활성물질인 FGal을 생산하기 위해 대사공학기법을 도입한 후 발효를 실시하였다. 도 6A는 재조합 대장균을 이용하여 FGal을 생산하는 모식도로, 도너인 GDP-푸코오스를 대장균 세포 내에서 생산하기 위해 디노보 경로(*de novo* pathway)에 관여하는 효소인 ManB, ManC, Gmd 및 WcaG를 도입하였으며 갈락토오스를 수용체로 공급하였다. 갈락토오스를 수용체로 사용하기 위해 갈락토오스를 대사하지 못하는 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 균주를 숙주로 사용하였다. 알파-1,2-푸코실트랜스퍼레이즈는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 유래의 FucT2를 사용하였으며 글리세롤을 탄소원으로 공급해주었다. 갈락토오스 2 g/L와 글리세롤 5 g/L를 함유한 LB 브로스 배지에서 재조합 대장균을 37℃에서 6시간 배양한 후, IPTG를 넣고 25℃로 온도를 낮추어 배양하였다.
- [0109] 도 6B에 나타난 바와 같이, 90시간 배치 발효 후 1.7 g/L의 FGal을 생산하였다.
- [0110] 도 6C는 페드-배치 발효를 수행한 결과로, 90시간 발효 후 약 12 g/L의 FGal을 생산하였고, 120시간 발효 후 최대 17.7 g/L의 FGal을 생산하였다.
- [0112] <실시예 4> 대사공학기법을 통해 생산된 2-푸코실갈락토오스의 구조 규명
- [0113] 재조합 대장균을 통해 생산한 FGal의 구조를 확인하기 위해 배양액으로부터 FGal의 정제를 수행하였다. 이때 G-10 column resin 및 물을 이동상으로 사용하여 크기-배제 크로마토그래피를 수행하였으며 HPLC 분석을 통해 고순도로 정제된 FGal 분획을 확인하였다. HPLC 분석에는 Rezex ROA-Organic Acid H+(8%) 컬럼(Phenomenex Inc)

을 사용하였고, 50℃에서 이동상 0.005N 황산 용액을 0.6 mL/min의 속도로 흘려주었다.

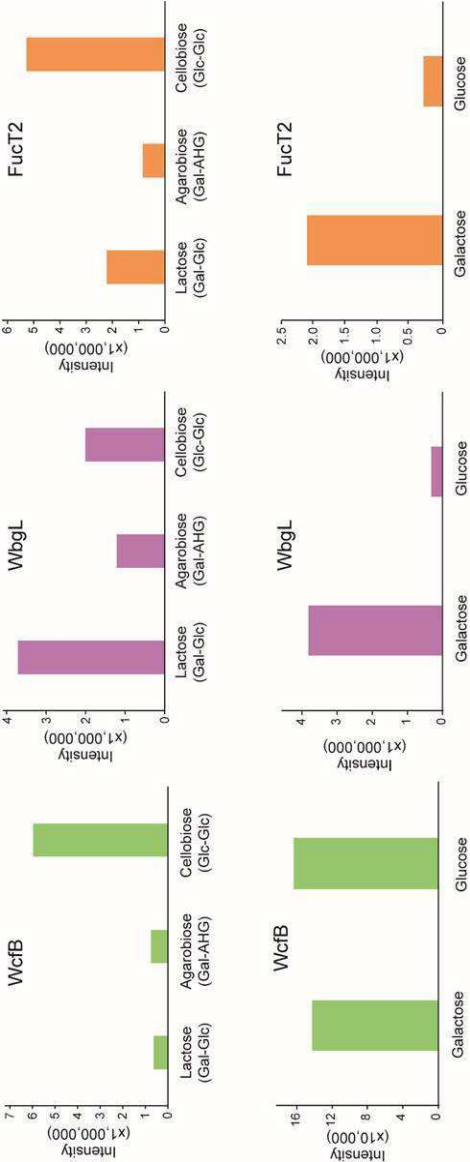
- [0114] 정제한 FGal의 알파-1,2-글리코시드 결합을 확인하기 위해 FGal을 기질로 잔토모나스 마니호티스(*Xanthomonas manihotis*) 유래의 알파-1,2-퓨코시테이즈의 효소 반응을 실시하였다.
- [0115] 이를 위해, 잔토모나스 마니호티스(*Xanthomonas manihotis*) 유래의 알파-1,2-퓨코시테이즈(NCBI Reference Sequence: WP_017167782.1) 코딩 유전자를 pETduet 벡터에 도입한 후 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 균주에 형질 전환을 실시하였다. 효소 반응 시 1 mg/mL 농도의 FGal을 기질로 사용하였으며 1 mg/mL의 재조합 대장균 세포내 조효소를 사용하였으며 20 mM Tris-HCl 버퍼(pH 7.0) 조건에서 30℃에서 6시간 효소반응을 수행하였다. 이때, 컨트롤 조건으로는 효소 유전자가 없는 빈 벡터를 함유하는 재조합 대장균의 세포 내 조효소를 사용하여 효소 반응을 실시하였다.
- [0116] 도 7에 나타난 바와 같이, 정제한 2FG의 알파-1,2-퓨코시테이즈의 효소 반응을 통해 알파-1,2-글리코시드 결합을 규명하였다.
- [0118] <실시예 5> 2-퓨코실갈락토오스의 프리바이오틱 특성 규명
- [0119] FGal의 프리바이오틱 효과를 검증하기 위하여 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697, 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082 균주의 세포생장을 모니터링 하였다. 또한, 병원성 미생물의 FGal 발효능 시험을 위해 대장균(*E. coli*) O1:K1:H7과 살모넬라 엔테리카 세로바 티피무리움(*Salmonella enterica* serovar *typhimurium*) 균주의 세포생장을 모니터링 하였다. 이때 배지 조성은 BactoPeptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, K₂HPO₄ anhydrous 2 g/L, Na acetate anhydrous 5 g/L, NH₄ citrate tribasic 2 g/L, Mg sulfate heptahydrate 0.2 g/L, Mn sulfate 0.05 g/L, tween 80 (polysorbate 80) 1 mL/L, cysteine 0.5 g/L 및 정제한 FGal 3 g/L을 사용하였으며 37℃에서 배양하였다.
- [0120] 도 8에 나타난 바와 같이 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*) DSM 20082는 FGal을 세포 밖에서 푸코오스와 갈락토오스로 먼저 분해한 후 갈락토오스를 소량 대사하는 것을 확인하였으며, 비피도박테리움 롱검 인판티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) ATCC 15697은 세포 내 퓨코시테이즈를 통해 FGal를 갈락토오스와 푸코오스로 분해하여 모두 이용하였다.
- [0121] 도 9에 나타난 바와 같이, 병원성 미생물은 FGal를 대사하지 못하였다.
- [0122]

도면

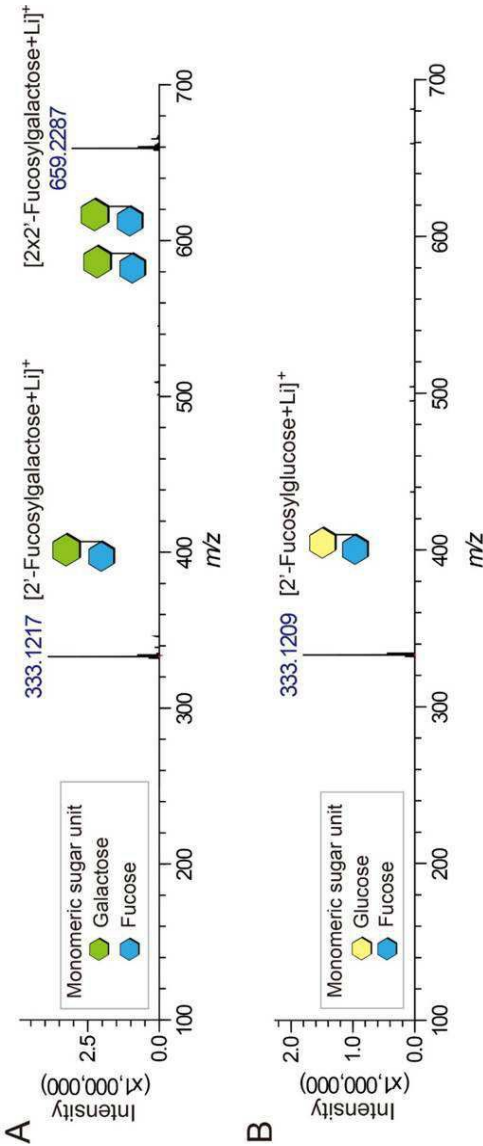
도면1



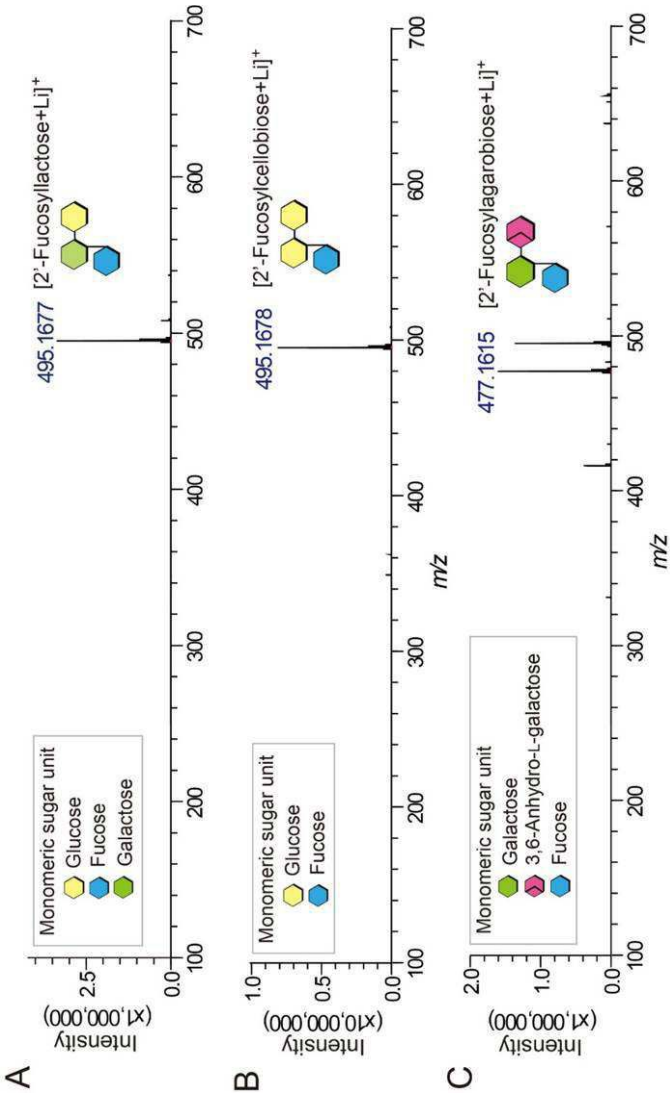
도면2



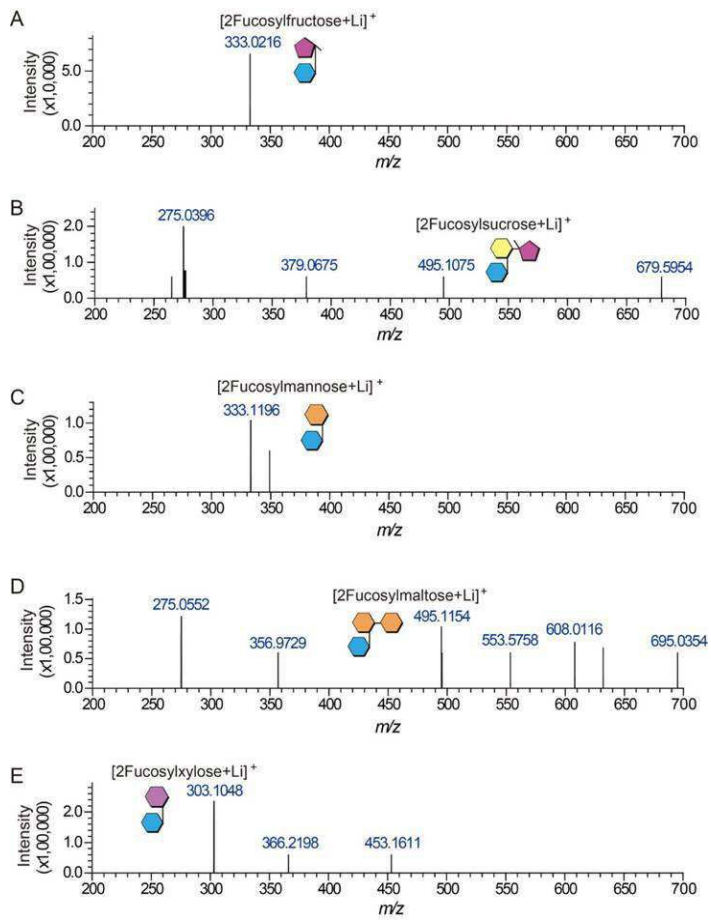
도면3



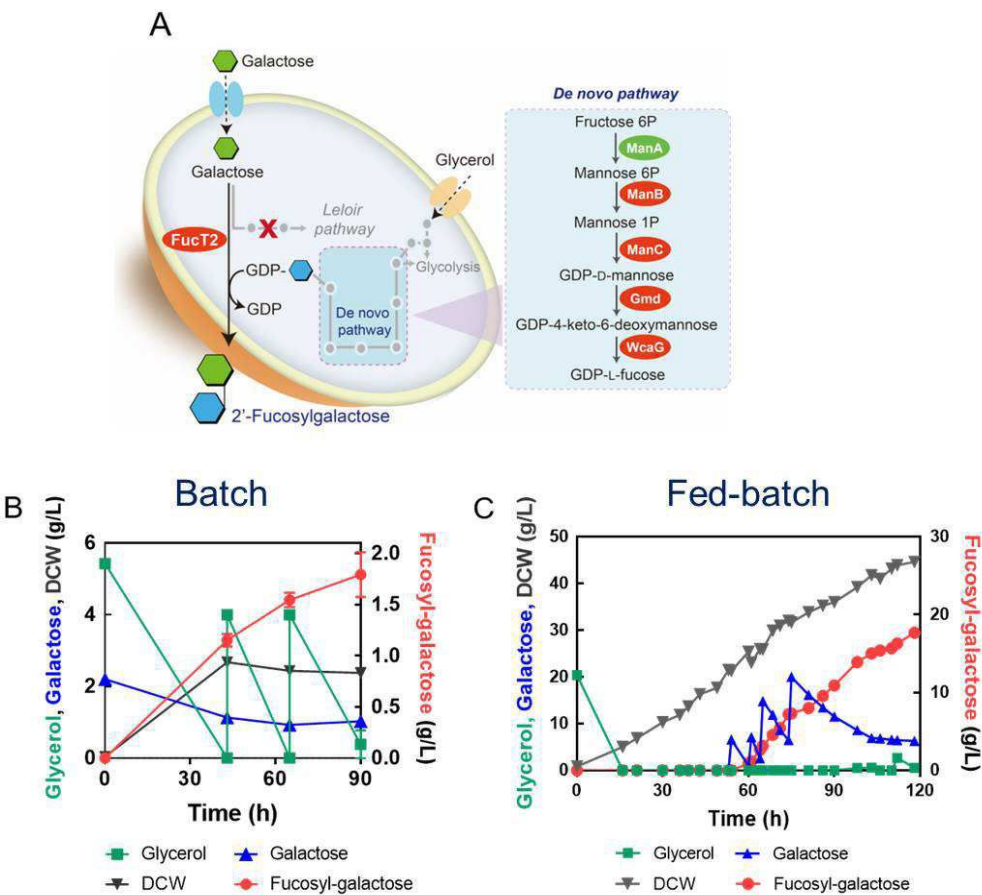
도면4



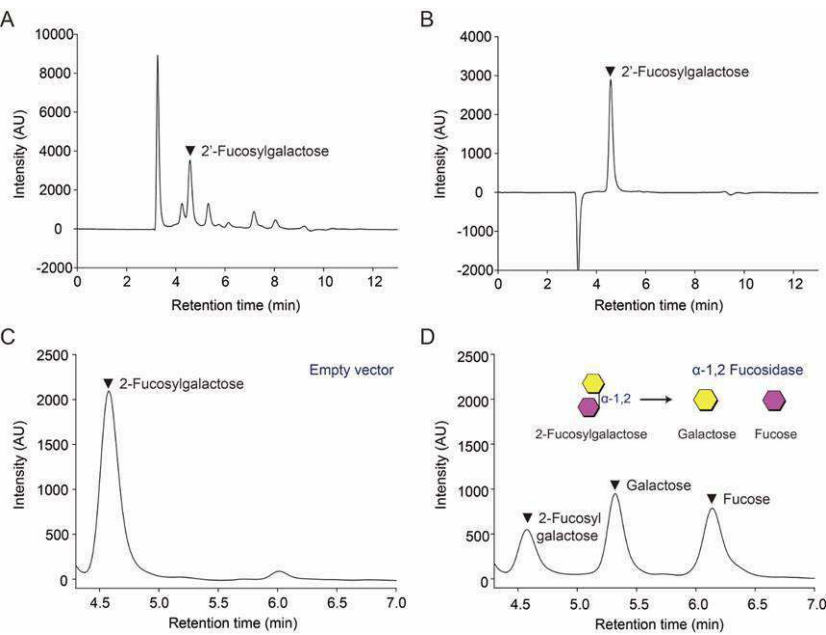
도면5



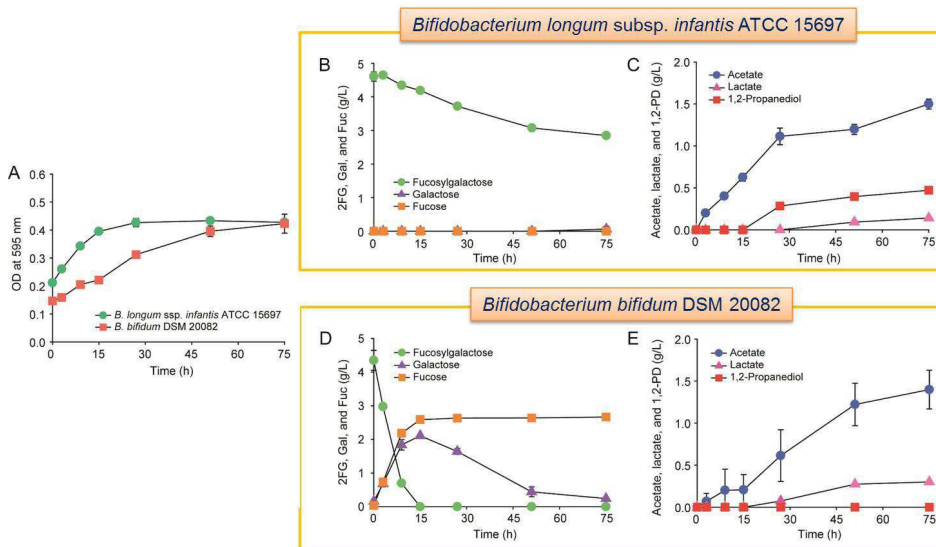
도면6



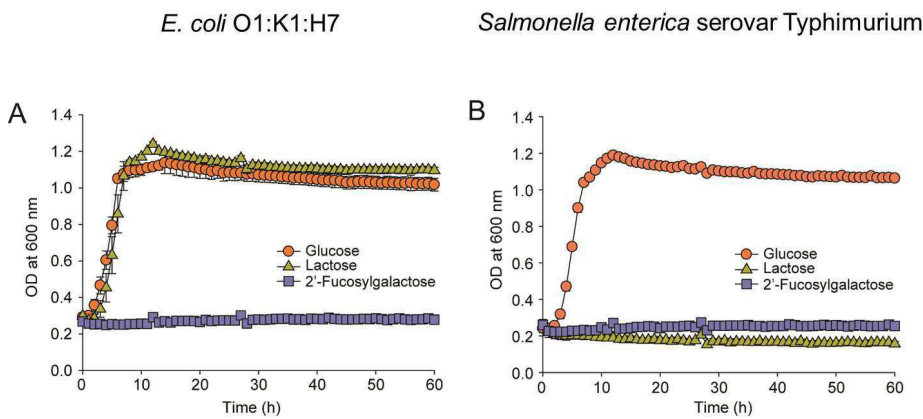
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Method for producing various novel fucosylated oligosaccharides and use thereof
- <130> P17U13C1282
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 287
- <212> PRT
- <213> Bacteroides fragilis
- <400> 1

Met Leu Tyr Val Ile Leu Arg Gly Arg Leu Gly Asn Asn Leu Phe Gln

1	5	10	15												
Ile	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Thr	Gln	Asn	Phe	Ile	Phe	Cys	Thr	Val
	20		25		30										
Asn	Lys	Asp	Gln	Glu	Arg	Gln	Val	Leu	Leu	Tyr	Lys	Asp	Ser	Phe	Phe
	35		40		45										
Lys	Asn	Ile	Lys	Val	Met	Lys	Gly	Val	Pro	Asp	Gly	Ile	Pro	Tyr	Tyr
	50		55		60										
Lys	Glu	Pro	Phe	His	Glu	Phe	Ser	Arg	Ile	Pro	Tyr	Glu	Glu	Gly	Lys
	65		70		75										
Asp	Leu	Ile	Ile	Asp	Gly	Tyr	Phe	Gln	Ser	Glu	Lys	Tyr	Phe	Lys	Arg
		85			90										
Ser	Val	Val	Leu	Asp	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	Asp	Glu	Leu	Arg	Lys	Lys
	100		105		110										
Ile	Trp	Asn	Ile	Cys	Gly	Asn	Ile	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Thr	Val	Ser
	115		120		125										
Ile	His	Val	Arg	Arg	Gly	Asp	Tyr	Leu	Lys	Leu	Pro	His	Ala	Leu	Pro
	130		135		140										
Phe	Cys	Gly	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Ala	Ile	Gln	Tyr	Ile	Gly	Glu
	145		150		155										
Asp	Lys	Ile	Phe	Ile	Ile	Cys	Ser	Asp	Asp	Ile	Asp	Trp	Cys	Lys	Lys
		165			170										
Asn	Phe	Ile	Gly	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Phe	Ile	Glu	Asn	Thr	Thr	Pro	Leu
	180		185		190										
Leu	Asp	Leu	Tyr	Ile	Gln	Ser	Leu	Cys	Thr	His	Asn	Ile	Ile	Ser	Asn
	195		200		205										
Ser	Ser	Phe	Ser	Trp	Trp	Gly	Ala	Trp	Leu	Asn	Glu	Asn	Ser	Asn	Lys
	210		215		220										
Ile	Val	Ile	Ala	Pro	Gln	Met	Trp	Phe	Gly	Ile	Ser	Val	Lys	Leu	Gly
	225		230		235										
Val	Ser	Asp	Leu	Leu	Pro	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Leu	Pro	Asn	Asn	Tyr
	245		250		255										

Thr Leu Gly Arg Tyr Cys Phe Ala Leu Tyr Lys Val Val Glu Asp Tyr
260 265 270

Leu Leu Asn Ile Leu Arg Leu Ile Trp Lys Arg Lys Lys Asn Met
275 280 285

<210> 2
<211> 297
<212> PRT
<213> E. coli 0126
<400> 2

Met Ser Ile Ile Arg Leu Gln Gly Gly Leu Gly Asn Gln Leu Phe Gln
1 5 10 15

Phe Ser Phe Gly Tyr Ala Leu Ser Lys Ile Asn Gly Thr Pro Leu Tyr
20 25 30

Phe Asp Ile Ser His Tyr Ala Glu Asn Asp Asp His Gly Gly Tyr Arg
35 40 45

Leu Asn Asn Leu Gln Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Gln Tyr Tyr Thr Pro
50 55 60

Lys Ile Asn Asn Ile Tyr Lys Leu Leu Val Arg Gly Ser Arg Leu Tyr
65 70 75 80

Pro Asp Ile Phe Leu Phe Leu Gly Phe Cys Asn Glu Phe His Ala Tyr
85 90 95

Gly Tyr Asp Phe Glu Tyr Ile Ala Gln Lys Trp Lys Ser Lys Lys Tyr
100 105 110

Ile Gly Tyr Trp Gln Ser Glu His Phe Phe His Lys His Ile Leu Asp
115 120 125

Leu Lys Glu Phe Phe Ile Pro Lys Asn Val Ser Glu Gln Ala Asn Leu
130 135 140

Leu Ala Ala Lys Ile Leu Glu Ser Gln Ser Ser Leu Ser Ile His Ile
145 150 155 160

Arg Arg Gly Asp Tyr Ile Lys Asn Lys Thr Ala Thr Leu Thr His Gly
165 170 175

Val Cys Ser Leu Glu Tyr Tyr Lys Lys Ala Leu Asn Lys Ile Arg Asp

180 185 190
 Leu Ala Met Ile Arg Asp Val Phe Ile Phe Ser Asp Asp Ile Phe Trp
 195 200 205
 Cys Lys Glu Asn Ile Glu Thr Leu Leu Ser Lys Lys Tyr Asn Ile Tyr
 210 215 220
 Tyr Ser Glu Asp Leu Ser Gln Glu Glu Asp Leu Trp Leu Met Ser Leu
 225 230 235 240

 Ala Asn His His Ile Ile Ala Asn Ser Ser Phe Ser Trp Trp Gly Ala
 245 250 255
 Tyr Leu Gly Ser Ser Ala Ser Gln Ile Val Ile Tyr Pro Thr Pro Trp
 260 265 270
 Tyr Asp Ile Thr Pro Lys Asn Thr Tyr Ile Pro Ile Val Asn His Trp
 275 280 285
 Ile Asn Val Asp Lys His Ser Ser Cys
 290 295
 <210> 3
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Helicobacter pylori

 <400> 3
 Met Ala Phe Lys Val Val Gln Ile Cys Gly Gly Leu Gly Asn Gln Met
 1 5 10 15
 Phe Gln Tyr Ala Phe Ala Lys Ser Leu Gln Lys His Leu Asn Thr Pro
 20 25 30
 Val Leu Leu Asp Thr Thr Ser Phe Asp Trp Ser Asn Arg Lys Met Gln
 35 40 45
 Leu Glu Leu Phe Pro Ile Asp Leu Pro Tyr Ala Asn Ala Lys Glu Ile
 50 55 60
 Ala Ile Ala Lys Met Gln His Leu Pro Lys Leu Val Arg Asp Ala Leu

 65 70 75 80
 Lys Tyr Ile Gly Phe Asp Arg Val Ser Gln Glu Ile Val Phe Glu Tyr
 85 90 95

Glu Pro Lys Leu Leu Lys Pro Ser Arg Leu Thr Tyr Phe Phe Gly Tyr
 100 105 110
 Phe Gln Asp Pro Arg Tyr Phe Asp Ala Ile Ser Ser Leu Ile Lys Gln
 115 120 125
 Thr Phe Thr Leu Pro Pro Pro Pro Glu Asn Asn Lys Asn Asn Asn Lys
 130 135 140

 Lys Glu Glu Glu Tyr Gln Arg Lys Leu Ser Leu Ile Leu Ala Ala Lys
 145 150 155 160
 Asn Ser Val Phe Val His Ile Arg Arg Gly Asp Tyr Val Gly Ile Gly
 165 170 175
 Cys Gln Leu Gly Ile Asp Tyr Gln Lys Lys Ala Leu Glu Tyr Met Ala
 180 185 190
 Lys Arg Val Pro Asn Met Glu Leu Phe Val Phe Cys Glu Asp Leu Lys
 195 200 205
 Phe Thr Gln Asn Leu Asp Leu Gly Tyr Pro Phe Thr Asp Met Thr Thr

 210 215 220
 Arg Asp Lys Glu Glu Glu Ala Tyr Trp Asp Met Leu Leu Met Gln Ser
 225 230 235 240
 Cys Lys His Gly Ile Ile Ala Asn Ser Thr Tyr Ser Trp Trp Ala Ala
 245 250 255
 Tyr Leu Met Glu Asn Pro Glu Lys Ile Ile Ile Gly Pro Lys His Trp
 260 265 270
 Leu Phe Gly His Glu Asn Ile Leu Cys Lys Glu Trp Val Lys Ile Glu
 275 280 285

 Ser His Phe Glu Val Lys Ser Gln Lys Tyr Asn Ala
 290 295 300