

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 3월 4일 (04.03.2021)



(10) 국제공개번호
WO 2021/040385 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 9/90 (2006.01) C12P 19/02 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01) C12P 19/24 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/011336
- (22) 국제출원일: 2020년 8월 25일 (25.08.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0106598 2019년 8월 29일 (29.08.2019) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)
[KR/KR]: 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김경현 (KIM, Kyoung Heon); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호, Seoul (KR). 남기현 (NAM, Ki Hyun); 02843 서울시 성북구 고려대로17가길 64, 106동 1404호, Seoul (KR). 김도형 (KIM, Do Hyoung); 16881 경기도 용인시 수지구 대지로 137, 107동 1401호, Gyeonggi-do (KR). 김인정 (KIM, In Jeong); 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

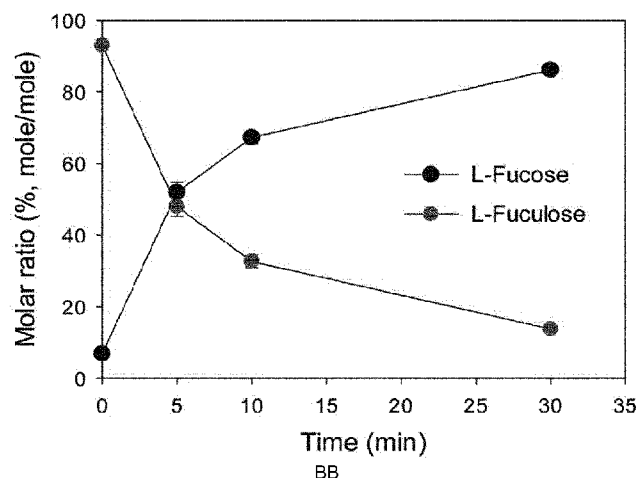
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL FUCOSE ISOMERASE AND FUCOSE PRODUCTION METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 신규한 푸코스 이성화효소 및 이를 이용한 푸코스 생산방법



(57) Abstract: The present invention relates to a novel fucose isomerase and a fucose production method using same. More specifically, in a reversible reaction between L-fucose and L-fuculose, an L-fucose isomerase, derived from a *Raoulthella* sp. KDH 14 strain isolated from abalone intestines, favors the reaction progressing from L-fuculose to L-fucose, and thus the present invention provides the effect of applying same to the production of L-fucose.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 푸코스 이성화효소 및 이를 이용한 푸코스 생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 전복 내장에서 분리한 라울텔라 종(*Raoulthella* sp.) KDH 14 균주에서 유래한 L-푸코스 이성화효소는 L-푸코스 및 L-푸쿨로스 간의 가역반응에서 L-푸쿨로스에서 L-푸코스로 진행되는 반응을 선호하여 L-푸코스의 생산에 적용하는 효과를 제공한다.

WO 2021/040385 A1

명세서

발명의 명칭: 신규한 푸코스 이성화효소 및 이를 이용한 푸코스 생산방법

기술분야

- [1] 본 발명은 L-푸코스와 L-푸쿨로스(fuculose) 간의 이성질화 반응을 가역적으로 촉매하고 전복 내장에서 분리한 신규한 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 푸코스 이성화효소 및 이를 이용한 푸코스 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] L-푸코스(L-fucose, 6-deoxy-L-galactose)는 세균에서 사람까지 다양한 생물체에서 발생하는 희귀 당이다. 예를 들어, L-푸코스는 사람의 모유 올리고당(human milk oligosaccharide; HMO)이나 당 단백질의 형태로 발견되며, 미생물의 세포외 다당류(exopolysaccharide; EPS)와 해조류의 구성성분으로 존재하기도 한다. 다양한 생리활성 특성으로 인해 L-푸코스는 의약분야에서 항염증, 항종양 및 면역 증진 약물로 사용되거나, 화장품 산업에서 미백, 피부 보습 및 노화 방지제로 사용되거나, 혹은 영양제로 사용될 수 있다. 이처럼 L-푸코스는 다양한 생리활성을 가지고 있기 때문에 제약, 의학, 식품, 화장품 분야에 다양하게 적용 가능하다.
- [3] 산업적 응용을 위해서, L-푸코스는 크게 세 가지 방법으로 생산가능(다당류의 가수분해, 화학적, 효소적 합성)하다. 첫째, 다당류로부터 가수분해하는 방법은, 푸코스를 함유한 해조류나 미생물의 세포외 다당류를 산 혹은 효소적으로 처리하여 푸코스를 얻는 방법이다. 둘째, 화학적 합성은 D-갈락토스나 D-만노스 같은 저렴한 당으로부터 화학물질을 이용하여 L-푸코스를 합성하는 방법이다. 위 두 가지 방법은 수율이 낮고, 부산물을 생산하며, 노동이 많이 든다는 단점이 있다. 즉, 경제적 효용성이 낮다. 이에 비해, 효소적 합성방법은 특이적으로 L-푸코스 생산이 가능하고, 친환경적이며, 비용적으로 효율적으로 생각된다. 효소적 방법에 기반한 L-푸코스의 합성 방법은 크게 두 가지로 알려져 있는데, 두 반응 모두 L-푸쿨로스가 중간체로 관여한다. 하나는 L-푸코스의 대사 과정 중의 알돌 반응(aldol reaction)에 기반한 방법으로, 락탈알데히드(Lactaldehyde)와 디하이드록시아세톤인산염(DHAP)이 알돌 반응을 거친 후, 산성 인산 가수분해효소(acid phosphatase)에 의해 탈인산화를 거친 후 L-푸쿨로스가 생산된다. 두 번째는 효소·화학적 방법으로 먼저 D-갈락토스를 출발물질로 사용하여 화학적 방법으로 L-푸시톨이 합성되고, 이어서 탈수소 효소(dehydrogenase)에 의해 L-푸쿨로스로 전환된다. 두 방법 모두 중간체 L-푸쿨로스를 L-푸코스로 전환시키기 위해서 L-푸코스 이성화효소(EC 5.3.1.25)가 필요하다. L-FucI는 L-푸코스와 L-푸쿨로스의 상호 변환을 촉매하는 케톨 이성화효소(ketol isomerase)의 일종이다. L-푸코스와 L-푸쿨로스 간의

반응은 가역적으로, 평형 상태에 도달함으로써 인한 L-푸코스의 생산 수율 증진에 한계가 있다. 따라서 역으로 가는 반응 즉, L-푸쿨로스에서 L-푸코스로 가는 반응을 선호하는 L-FucI를 이용하면, L-푸코스의 효소적 생산에 유리하다. 이와 같이 효소적 방법이 매력적임에도 불구하고, 현재까지 L-푸코스와 L-푸쿨로스의 가역반응을 연구한 사례는 두 가지 밖에 없다. 이들은 역반응을 더 우호적으로 촉매하였음에도 불구하고, L-푸쿨로스를 기질로 연구하지는 않았다. 사실, L-푸코스 합성을 위한 이성화효소의 응용성을 높이기 위해서는 L-푸쿨로스를 기질로 한 연구가 필요한데, 이러한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 역반응이 우세한 이성화효소를 새롭게 발굴하고, 이의 가역반응을 조사하여 L-푸쿨로스를 기질로 생화학적 특성규명을 하는 것은 중요한 일이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명의 목적은 푸코이단을 탄소원으로 사용하는 전복 내장에서 분리한 신규한 미생물을 제공하는 것이다.
- [5] 본 발명의 다른 목적은 상기 미생물에서 분리하고 L-푸코스 및 L-푸쿨로스 간의 가역반응에서 L-푸쿨로스에서 L-푸코스로의 전환 반응을 선호하는 신규한 L-푸코스 이성화효소 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규한 미생물 및 이로부터 유래한 L-푸코스 이성화효소를 이용하여 L-푸코스를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 이루어지고, L-푸코스 및 L-푸쿨로스 간의 가역반응에서 L-푸쿨로스에서 L-푸코스로의 전환 반응을 선호하는 L-푸코스 이성화효소(L-fucose isomerase)를 제공한다.
- [8] 본 발명은 또한 상기 L-푸코스 이성화효소를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [9] 본 발명은 또한 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [10] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [11] 본 발명은 또한 상기 숙주세포를 배양하여 L-푸코스 이성화효소를 발현하는 단계; 및 상기 발현된 L-푸코스 이성화효소를 회수하는 단계를 포함하는 L-푸코스 이성화효소의 제조방법을 제공한다.
- [12] 본 발명은 또한 상기 L-푸코스 이성화효소; 및 L-푸쿨로스 및 D-리불로스로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 기질을 포함하는 L-푸코스 생산용 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명은 또한 상기 L-푸코스 이성화효소를, L-푸쿨로스 및 D-리불로스로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 L-푸코스의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명의 전복 내장에서 분리한 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주에서 유래한 L-푸코스 이성화효소는 L-푸코스 및 L-푸쿨로스 간의 가역반응에서 L-푸쿨로스에서 L-푸코스로 진행하는 반응을 선호하여 L-푸코스의 생산에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주의 16S rRNA 기반 계통수를 나타낸다.
- [16] 도 2는 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI* 유전자 서열을 나타낸다.
- [17] 도 3은 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*의 젤 여과 크로마토그래피 결과와 His-Trap 컬럼을 이용한 친화도 크로마토그래피에 의해 정제된 SDS-PAGE 결과(내부 도면)를 나타낸다.
- [18] 도 4a는 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*에 의한 L-푸코스에서 L-푸쿨로스(정방향 반응)의 효소적 전환을 나타낸다.
- [19] 도 4b는 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*에 의한 L-푸쿨로스에서 L-푸코스(역방향 반응)의 효소적 전환을 나타낸다.
- [20] 도 5a는 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*의 푸쿨로스에 대한 온도 효과를 나타낸다.
- [21] 도 5b는 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*의 푸쿨로스에 대한 pH 효과를 나타낸다.
- [22] 도 6은 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*의 기질 특이성을 나타낸다.
- [23] 도 7a-b는 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*의 전체 구조 및 올리고머 형태를 나타낸 것으로,
- [24] 도 7a는 *RdFucI* 단량체의 만화 표현으로 *RdFucI* 단량체는 N1-(황색), N2-(분홍색) 및 C-(녹색) 도메인으로 구성된다.
- [25] 도 7b는 *RdFucI* 6량체의 표면 표현으로, 서브 유닛 A, B, C, D, E 및 F는 각각 노란색, 분홍색, 청록색, 보라색, 녹색 및 주황색으로 표시된다. 기질 결합 포켓 부위 상의 금속 결합 부위는 적색 원점으로 표시된다.
- [26] 도 8a-f는 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*의 결합 인식 및 활성 부위를 나타낸 것으로,
- [27] 도 8a에서, 기질 결합 포켓은 서브 유닛 A 및 C에 의한 조립에 의해 형성된다.
- [28] 도 8b는 기질 결합 포켓의 정전기 표면을 나타낸다.
- [29] 도 8c는 기질 결합 표면의 B-인자를 제시한다.
- [30] 도 8d는 기질 결합 포켓의 단면 표면도이다. *RdFucI*의 금속 결합 부위에 대한 2Fo-F 전자 밀도 맵(회색 메쉬, 1.0σ에서 윤곽이 있음)은 10 mM Mn²⁺를 포함하는 용액에 담긴다.

- [31] 도 8f는 *RdFucI*의 Mn²⁺ 결합 부위의 기하학적 분석 결과이다.
- [32] 도 9a-d는 본 발명의 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래의 *RdFucI*와 기존 *FucI*와의 구조적 차이점을 나타낸다.
- [33] *EdFucI*(PDB 코드 : 1FUI), *ApFucI*(3A9R) 및 *SpFucI*(4C20)과 *RdFucI*의 (도 9a) 활성 부위 및 (도 9b) 기질 결합 표면의 중첩을 나타낸다. L-*FucI*로부터 α 8- α 9 루프의 큰 형태적 차이의 확대도를 삽입하였다(왼쪽).
- [34] 도 9c는 *RdFucI*, *EcFucI*, *ApFucI* 및 *SpFucI*에 대한 α 8- α 9 루프 영역에 대한 부분 서열 정렬이다.
- [35] 도 9d는 *RdFucI*, *EcFucI*, *ApFucI* 및 *SpFucI*의 정전기 표면 표현이다. 깊은 기질 결합 포켓 및 α 8- α 9 루프 영역은 각각 주황색 및 검은색 점으로 표시한다. 금속 결합 부위는 노란색 별표로 표시한다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [37] 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 이루어지고, L-푸코스 및 L-푸쿨로스 간의 가역반응에서 L-푸쿨로스에서 L-푸코스로의 전환 반응을 선호하는 L-푸코스 이성화효소(L-fucose isomerase)에 관한 것이다.
- [38] 본 발명자들은 전복 내장으로부터 해조류의 구성성분인 푸코이단을 유일 탄소원으로 성장하는 라울텔라(*Raoultella*) 속에 속하는 새로운 미생물 종을 분리하였다. 분리한 균주는 16S rRNA 시퀀싱 기반 계통수에 의해 라울텔라(*Raoultella*) 속의 신규 종으로 파악되었고, 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14로 명명하였다. 푸코스의 이성화효소를 찾기 위해 유전체 서열 분석을 시행하여 전장 유전체 서열을 확인하였으며, BLAST 기반 서열 유사성을 파악하여 푸코스 이성화효소를 동정하였다(*RdFucI*). 아울러, 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주 유래 L-*FucI*의 L-푸코스과 L-푸쿨로스 간의 가역 반응을 연구하여 평형 상태에서의 혼합물 비율을 조사하고, L-푸쿨로스를 기질로 여러 생화학적 특성(온도, pH, 금속 이온 효과)을 규명하였다. 또한, 구조 분석을 통해 분자적 수준에서의 작용 기작을 이해하고 기존 L-*FucI*와의 차이를 파악하였다.
- [39] 그 결과, *RdFucI*는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을, SEQ ID NO: 2의 염기 서열로 이루어지며, L-푸코스보다 L-푸쿨로스에 더 높은 활성을 보였고, 반응 속도 또한 L-푸쿨로스에서 L-푸코스로 가는 반응이 5배 정도 빨랐다. 평형상태에서는 L-푸코스와 L-푸쿨로스가 약 9:1의 비율로 존재했다. 이 같은 결과는 *RdFucI*에 의해 촉매되는 반응은 L-푸코스의 생성을 훨씬 더 선호함을 보여준다. 이러한 특성은 L-*FucI*을 가지고 L-푸코스를 산업적으로 생산하는 데에 유리하다.
- [40] 본 발명의 L-푸코스 이성화효소는 L-푸코스 및 L-푸쿨로스 간의 가역반응에서 L-푸쿨로스에서 L-푸코스로 진행되는 반응을 선호하여 기질로 L-푸코스 및 L-푸쿨로스 중 어느 것을 사용하더라도 평형상태에서 L-푸코스의 비율은 90%

이상을 나타낸다.

- [41] 또한, L-퓨쿨로스를 기질로 사용하는 경우, 30 내지 50°C에서 80% 이상의 상대 최대 효소 활성을 나타낸다. 그러나, 상기 온도 범위를 벗어나는 경우 효소 활성은 50% 미만으로 떨어진다. 아울러, 소듐 아세테이트 버퍼, 소듐 포스페이트 버퍼 및 글리신-NaOH 버퍼에서 pH 6-11에서 70% 이상의 상대 최대 활성을 나타내는 반면, Tris-HCl 버퍼의 경우 상기 pH 조건에서 활성이 낮았는데 이는 Tris가 효소의 저해제로 작용할 수 있음을 의미한다.
- [42] 또한, 일반적으로 당 이성화효소는 금속 이온을 보조인자로 필요로 하는데, 본 발명의 L-퓨코스 이성화효소는 Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 금속 이온 하에서 반응 시 높은 상대 활성을 나타낸다. 특히 Mn^{2+} 의 존재 하에서 효소의 활성은 7배 가량 증진된다. 뿐만 아니라 본 발명의 L-퓨코스 이성화효소는 Fe^{2+} , Ca^{2+} 및 Cu^{2+} 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 금속 이온에 의해 활성이 저해될 수 있다(표 1 참조).
- [43] 또한, 일반적으로 당 이성화효소는 다양한 기질 반응성을 나타내는 데, 본 발명의 L-퓨코스 이성화효소는 L-퓨쿨로스 및 D-리블로스에 대해 높은 활성을 나타내어 알도오스 기질보다는 케토오스 기질에 대해 훨씬 우세한 반응을 보인다(도 6 참조).
- [44] 한편, 본 발명의 L-퓨코스 이성화효소는 결정 구조 분석을 통하여 활성 자리 부근의 루프 형태(loop conformation)가 기존에 밝혀진 L-FucI 들과 차이가 있음을 확인하였는데, 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [45] 단량체 *RdFucI*는 N1, N2 및 C 도메인을 포함하는 19개의 α -나선과 23개의 β -가닥으로 이루어져 있다(도 7a). N1 도메인(Ser5-Met172)은 α/β - 폴드를 채택하고 *RdFucI*의 6량체 형성의 기질 인식에 관여한다. N2 도메인(Lys173-Leu352) 및 C 도메인(Thr353-Arg591)은 촉매 활성과 관련된 금속 결합 잔기를 포함한다(도 7a). *RdFucI* 서브 유니트는 삼량체의 이량체에 D3h 가상 대칭성을 이루고 있다. 기질 결합 포켓은 서브 유니트 A의 N2 및 C 도메인과 서브 유니트 B의 N1 도메인에 의해 형성되며(도 8a-c), homohexameric *RdFucI*에서 총 6개의 기질 결합 부위를 갖는다. 기관이 접근하는 기관 결합 포켓의 입구는 약 $11 \times 12.5 \text{ \AA}$ 이다(도 8a). 금속 결합 부위가 형성되는 기관 결합 포켓은 약 $4 \times 5 \text{ \AA}$ 의 음으로 하전된 표면을 갖는다(도 8b). 금속 결합 부위와 기질 결합 포켓 사이의 거리는 $\sim 16.7 \text{ \AA}$ (도 8d)이며, 이것은 활성 센터가 주머니 깊숙이 자리 잡고 있음을 의미한다. 이것은 기관의 개방형 및 환형 모두 활성 부위 중심에 접근 가능하다는 것을 나타내며, 반면에 벌크 사카라이드는 기질 결합 포켓 내부에 존재하는 활성 부위에 접근할 수 없음을 나타낸다. 기질 결합 포켓의 중첩은 기질 인식 잔기(Arg16, W88, Gln300, Tyr437, Trp496 및 Asn524)가 경미한 입체 구조를 나타내는 반면, 금속 결합 잔기 Glu337, Asp361, His528(*RdFucI*에서 번호 매김)이 다른 단백질과 위치적으로 동일하다는 것을 보여준다. 반면, 기질 결합 포켓의 표면 상에 놓인 각 L-FucI의 $\alpha 7$ - $\alpha 8$ 루프는 상이한 형태를

찾는다. L-FucI의 서열 정렬은 높은 유사성을 나타내지 만, 각 L-FucI의 $\alpha 7$ - $\alpha 8$ 루프에 대한 서열은 매우 다양하다(도 9b). $\alpha 7$ - $\alpha 8$ 루프가 기질 결합 포켓의 구조 형성에 관여하기 때문에 각 L-FucI는 독특한 기질 결합 포켓을 형성한다(도 9c). L-FucI는 일반적으로 금속 결합 부위 주위에 음으로 하전된 표면을 가지지만, 기질 결합 포켓의 표면은 상이한 전하 상태를 나타낸다(도 9c). 결과적으로, $\alpha 7$ - $\alpha 8$ 루프 구조의 차이는 L-FucI의 기질 특이성에 차이를 야기할 수 있다.

- [46] 또한, 본 발명의 L-퓨코스 이성화효소는 효소의 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, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열로부터 전사 및 번역될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 L-퓨코스 및 L-퓨쿨로스 간의 가역반응에서 L-퓨쿨로스에서 L-퓨코스로의 전환 반응을 선호하는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 SEQ ID NO: 1에 개시된 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.
- [47] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.
- [48] 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 NAR25:3389-3402)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.
- [49] 상기 L-퓨코스 이성화효소는 퓨코이단을 탄소원으로 사용하는 본 발명의 신규 균주 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14의 배양물의 상등액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.

- [50] 제조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 제조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 예컨대, 상기 L-퓨코스 이성화효소를 코딩하는 유전자, 즉, SEQ ID NO: 2에 기재된 염기 서열을 포함하는 제조합 벡터로 형질전환된 숙주세포 또는 이의 배양물로부터 수득될 수 있다. 상기 숙주세포로 대장균을 사용하나, 이에 제한하는 것은 아니다.
- [51] 상기 L-퓨코스 이성화효소는 L-퓨쿨로스 및 D-리불로스 등을 기질로 사용할 수 있다.
- [52]
- [53] 본 발명은 또한 상기 L-퓨코스 이성화효소를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [54] 본 명세서에서, 용어 "핵산 분자"는 cDNA, genomic DNA, 합성 DNA 또는 RNA, PNAS 또는 LNA 기원의 임의의 단일 또는 이중 나선 핵산 분자, 또는 이들의 혼합물을 의미한다. "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 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포괄한다. 상기 "핵산 분자"에는 본 발명에 따른 L-퓨코스 이성화효소 및 이의 기능적 동등물을 암호화하는 a) 핵산 염기 서열, 또는 b) 이들 서열과 매우 엄격한 조건(high stringent condition) 하에서 하이브리드화하는 서열들을 모두 포함한다. 매우 엄격한 조건은 공지된 문헌(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)에 기재된 바와 같다. 또한, 상기 a) - b)의 핵산 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열이 포함될 수 있다. 또한, 상기 a) - b)의 임의의 핵산 분자의 단편 또는 보체(complement)가 포함될 수 있다.
- [55] 본 발명의 L-퓨코스 이성화효소를 코딩하는 핵산 분자는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 나타내는 L-퓨코스 이성화효소를 코딩하는 염기 서열 및 이와 상동성을 가지는 염기 서열을 가질 수 있고, 보다 바람직하게 SEQ ID NO: 2의 염기 서열 또는 이와 상동성을 가지는 염기 서열을 가질 수 있다.
- [56] 본 발명의 L-퓨코스 이성화효소를 코딩하는 핵산 분자는 본 발명에서 개시한 서열 정보로부터 당 분야에 공지된 핵산 분자 구축 방법에 의해 수득될 수 있다. 예컨대, 출발물질로서의 핵산 분자는 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주로부터 단리될 수 있고 및/또는 본 발명에서 개시한 염기 서열을 기초로 하여 합성에 의해 제조될 수 있다.
- [57] 본 발명의 L-퓨코스 이성화효소를 코딩하는 핵산 분자는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 즉 이에 제한되는 것은 아니지만 다른 염색체 DNA 및

RNA, 및 염색체 외 DNA 및 RNA와 같은 다른 염기 서열이 실질적으로 존재하지 않는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 당분야의 통상의 기술자에게 공지된 핵산 분자 정제 방법이 단리된 핵산 분자를 수득하기 위해 사용될 수 있다. 또는, 본 발명의 핵산 분자는 프로모터, 박테리아 세포의 경우 필요에 따라 리보솜-결합 부위 및 종결자가 작동적으로 연결된 기능성 폴리뉴클레오타이드이다.

[58]

[59] 본 발명은 또한 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[60] 본 명세서에 있어서, 용어 "플라스미드", "벡터" 또는 "발현 벡터"는 본 발명에서 상호 교환적으로 사용되며, 인 비보(*in vivo*) 또는 인 비트로(*in vitro*) 발현을 위한 컨스트럭트를 의미한다. 이들 컨스트럭트는 숙주세포로 L-퓨코스 이성화효소 인코딩 핵산 분자를 삽입하기 위해 사용될 수 있다. 이들 컨스트럭트에서 L-퓨코스 이성화효소 인코딩 핵산 분자는 숙주세포 내에서 발현될 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결(*operably linked*)되며, 숙주세포로 삽입되면, 벡터는 숙주 계놈과는 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나 또는 일부 경우에 숙주 계놈 그 자체에 통합될 수 있다. 통상적으로 플라스미드 벡터는 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, 플라스미드 벡터로 삽입된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자, 및 외래 핵산 분자가 삽입될 수 있도록 하는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 가진다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따라 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 사용하면 벡터와 외래 핵산 분자를 용이하게 라이게이션시킬 수 있다.

[61] 상기 "작동가능하게 연결된"은 적절한 핵산 분자가 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 것을 의미한다.

[62] 상기 "재조합"은 세포가 이중의 핵산 분자를 복제하거나, 상기 핵산 분자를 발현하거나 또는 펩타이드, 이중의 펩타이드 또는 이중의 핵산 분자에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 야생형 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 야생형 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으나, 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다. 상기 "벡터"는 세포 내로 핵산 분자를 전달한다. 상기 "벡터"에는 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 암호화하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[63] 숙주세포에서 발현하기 위해 사용될 수 있는 벡터는 당분야에 공지되어 있고, 특히 대장균(*E. coli*)에서 발현하기 위해 사용될 수 있는 적합한 벡터 또한 당분야에 공지되어 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 벡터로 pET28a를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

- [64] 본 발명은 또한 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [65] 본 명세서에서, 용어 "숙주세포"는 상술한 핵산 분자 또는 벡터를 포함하는 임의의 세포를 포함하며, L-푸코스 이성화효소의 재조합 생산에 이용될 수 있다. 숙주세포는 통상적으로 핵산 분자의 도입 효율이 높고, 도입된 핵산 분자의 발현 효율이 높은 것이 사용된다. 숙주세포는 원핵 또는 진핵 세포를 포함하며, 이러한 숙주세포를 포함하는 재조합 미생물로서, 예컨대 박테리아, 효소, 곰팡이 등이 이용될 수 있으며, 본 발명의 실시예에서는 대장균(*E. coli*)이 이용되었으나, 이에 제한되지 않고, 본 발명에 따른 L-푸코스 이성화효소 변이체가 충분히 발현될 수 있는 것이라면 어떠한 종류의 미생물이라도 무방하다.
- [66] 본 발명에 있어서, 핵산 분자를 숙주세포에 삽입하기 위해 통상적으로 알려진 조작방법을 사용할 수 있다. 예컨대, 미세사출법(microprojectile bombardment), 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 일렉트로포레이션(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포솜 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method), 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)를 이용할 수 있다.
- [67] 본 발명은 또한 상기 숙주세포를 배양하여 L-푸코스 이성화효소를 발현하는 단계; 및 상기 발현된 L-푸코스 이성화효소를 회수하는 단계를 포함하는 L-푸코스 이성화효소의 제조방법을 제공한다.
- [68] 재조합 숙주세포의 (대량) 배양을 위해, 다양한 배양 방법이 적용될 수 있는데, 예컨대 재조합 미생물로부터 발현 또는 과발현된 유전자 산물의 대규모 제조는 회분(batch) 또는 연속 배양 방법에 의해 달성될 수 있다. 회분 및 유가식(fed-batch) 배양 방법은 통상적인 것으로서 당분야에 공지되어 있다. 연속 배양 공정을 위한 영양분 및 성장 인자의 조절 방법, 뿐만 아니라 생성물 형성을 최대화 하기 위한 기법은 미생물 산업 분야에 공지되어 있다. 또한, 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄로 구성된 배지를 사용할 수 있으며, 당분야에 공지된 바에 따라 조성 구성할 수 있다.
- [69] 본 발명은 또한 상기 L-푸코스 이성화효소; 및 L-푸쿨로스 및 D-리블로스로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 기질을 포함하는 L-푸코스 생산용 조성물을 제공한다.
- [70] 상기 조성물은 액상 내지 고상일 수 있다. 조성물에는 L-푸코스 이성화효소를 단독으로 포함할 수도 있고, 다른 단백질 또는 효소를 함께 포함할 수도 있으며, 조성물 내 L-푸코스 이성화효소, 다른 단백질, 또는 효소의 안정성 및/또는 활성을 보충할 추가 첨가제를 포함할 수도 있다. 예컨대, 글리세롤, 소르비톨, 프로필렌 글리콜, 염, 슈가, pH-버퍼, 보존제 및 카보하이드레이트가 있으나,

이에 한정되지 않는다. 통상적으로 액상 조성물은 물 또는 오일 기반의 슬러리, 현탁액 또는 용매이다. 고상 조성물은 스프레이-건조, 동결건조(lyophilisation), 다운-드라우트 증기법(down-draught evaporation), 썬-레이어 증기법(thin-layer evaporation), 원심분리 증기법(centrifugal evaporation), 컨베이어 건조, 또는 이들의 조합에 의해 액상 조성물로부터 제조될 수 있다. 고상 조성물은 식품 또는 사료에 적용하기 적합한 크기로 과립화할 수 있다.

[71] 또한, 본 발명은 상기 L-푸코스 이성화효소를, L-푸쿨로스 및 D-리블로스로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 L-푸코스의 생산방법을 제공한다.

[72] 상기 반응은 완충 용액 내에서 수행될 수 있고, 상기 L-푸코스 이성화효소의 최적 pH는 완충용액의 종류에 따라 달라질 수는 있으나 약 pH 6 내지 11일 수 있다. 반응 온도는 30 내지 50 °C일 수 있다. 50°C 이상에서는 효소 활성이 급격히 저하됨에 따라 상기 L-푸코스 이성화효소는 실온에서도 충분히 효소 반응이 가능하므로 온도를 높이기 위한 에너지 소비 없이도 경제적으로 공정을 수행할 수 있는 장점이 있다. 또한, 기존 효소들에 비해 상대적으로 낮은 온도에서의 열처리에도 효소를 불활성화시킬 수 있다.

[73] 따라서, 바람직하게는, 반응 조건은 30 내지 50 °C, pH 6 내지 11의 조건에서 5분 내지 1 시간 동안 수행하는 것일 수 있다.

[74] 상기 완충용액은 소듐 아세테이트 버퍼, 소듐 포스페이트 버퍼, 글리신-NaOH 버퍼 등일 수 있다. 예외로, Tris-HCl 버퍼의 경우 Tris가 효소의 저해제로 작용할 수 있어 사용 제한이 필요하다.

[75] 또한, 상기 L-푸코스 이성화효소의 효소 활성화에 대한 금속이온의 효과를 확인한 결과, Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} 및 Zn^{2+} 는 효소 활성을 증가시키지만, Fe^{2+} , Ca^{2+} 및 Cu^{2+} 의 경우 효소 활성을 저해한다. 따라서, 효소 활성을 증가시키는 금속 이온 하에서 반응시켜 L-푸코스의 생산을 높일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[77] <실시예 1> 미생물 분리동정 및 유전자 동정

[78] 본 발명의 FucI 효소의 미생물원은 라울텔라(*Raoultella*) 속에 속하는 세균으로, 전복 내장으로부터 해조류의 구성성분인 푸코이단을 유일 탄소원으로 생장하는 능력을 바탕으로 분리하였다. 분리한 균주는 16S rRNA 시퀀싱(16S rRNA 서열은 박테리아 16S rRNA 프라이머 27F (5'-TTGATCCTGGCTCAG-3': SEQ ID NO: 3) 및 1492R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3': SEQ ID NO: 4)를 이용한 PCR을 통해 증폭되고 NCBI 데이터베이스에서 RNA 서열에 대한 유사성을 비교함) 기반 계통수에 의해 라울텔라(*Raoultella*) 속의 신규 종으로 파악되었고, 본 발명에서 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14로 명명되었다. 푸코스의

이성화효소를 찾기 위해 유전체 서열 분석을 시행하였고, BLAST 기반 서열 유사성을 파악하여 퓨코스 이성화효소를 동정하였다. 균주 동정 관련 계통수는 도 1에 나타나 있으며, 상기 내용의 상세 과정은 다음과 같다.

[79] 1) 전복 내장은 분해되어 물에 희석하여 2% 푸코이단을 함유한 M9 최소배지에 접종하였다.

[80] 2) 접종된 세포는 30°C에서 배양하였다.

[81] 3) 세포생장은 Synergy HTX multi-mode reader를 통해 확인하여, 성장속도가 높은 균주를 분리하였다.

[82] <실시예 2> *Rd FucI*의 클로닝, 발현 및 정제

[83] 본 발명에 사용한 *RdFucI* 유전자의 클로닝은 분리한 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14로부터 게놈 DNA를 추출한 다음, 중합연쇄반응을 통해 목적하는 유전자를 증폭하였다. 증폭된 타깃 유전자를 발현 벡터인 pET28a에 접합하여 클로닝을 완성하였다. 도 2는 유전자의 염기 서열을 나타낸다.

[84] 재조합 효소 단백질의 발현 숙주로는 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)가 이용되었다. 재조합 유전자를 대장균 세포에 형질전환시킨 후, 대장균 세포를 액체 배지(LB broth) 20mL에서 16시간 가량 종균 배양(seed culture)하였다. 이를 1L의 LB에 재접종하여 37°C에서 3-4시간 정도 더 배양하여 OD600의 수치가 0.6-0.8 정도 되었을 때, 온도를 16°C로 낮추고 최종 농도가 1mM이 되도록 isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 첨가하여 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 16시간 정도 대장균을 더 배양한 다음 원심분리를 통하여 세포를 회수하였다. 전 과정에서 50 μ g/mL의 카나마이신을 선별 마커로 사용하였다. 회수한 세포는 초음파 분쇄기를 통하여 파쇄시킨 후, 세포 내의 조 단백질을 추출하여 정제를 시행하였다. 정제 과정은 His-trap column을 이용한 친화 크로마토그래피법으로 수행하였고, 300mM의 이미다졸에서 대부분의 목표 단백질이 회수되었다.

[85] 도 3에 도시된 바와 같이, 65.5kDa 크기의 효소 단백질이 확인되었고, 591개의 아미노산으로 구성되었다.

[86] <실시예 3> 효소의 가역 반응

[87] 퓨코스-퓨쿨로스 간 반응에서 *RdFucI*이 어떤 반응을 선호하는지 파악하기 위해서, 재조합 효소의 가역반응을 시간별로 조사하였다. 이를 위해, 20mM 소듐 포스페이트(pH7)에 포함된 10mM L-퓨코스(도 4a) 또는 L-퓨쿨로스(도 4b)를 기질로 하여 1mM MnCl₂의 존재 하에서 1.5 μ g의 *RdFucI*와 30°C에서 각각 반응시켰고, L-퓨코스를 실험적으로 정량하였다. 반면 L-퓨쿨로스는 계산값으로 표현하였다.

[88] 그 결과, 역반응의 반응속도가 5배 정도 빨랐으며, 퓨코스와 퓨쿨로스 중 어떤 것을 기질로 사용하든지 간에 평형상태에서의 퓨코스와 퓨쿨로스의 비율이 약 90 : 10 이었다. 이는 *RdFucI*에 의한 촉매반응이 역반응 즉, 퓨코스를 생성하는 방향을 더 선호함을 의미한다.

- [89] <실시예 3> *Rd FucI*의 퓨쿨로스에 대한 생화학적 특성(온도, pH, 금속 이온) 규명
- [90] *RdFucI*의 잠재적 응용성을 위해서, 퓨쿨로스를 기질로 여러 생화학적 특성 규명을 할 필요가 있었다.
- [91] 1) 온도 효과: 10mM의 기질을 pH7에서 다양한 온도(10-80°C)에서 효소 1.5 μ g을 처리한 결과, 40°C에서 가장 높은 활성을 보였고 30, 40, 50°C에서 최대근사치를 보였다(최대활성의 80% 이상)(도 5a).
- [92] 2) pH 효과: 10mM의 기질을 40°C에서 다양한 pH 조건(pH4-11: 50mM 소듐 아세테이트(pH4-6), 50mM 소듐 포스페이트(pH6-8), 50mM Tris-HCl(pH7-9), 50mM 글리신-NaOH(pH9-11))에서 효소 1.5 μ g을 처리한 결과, 알칼리 조건(pH 9 및 10)에서 최대 활성을 보였으며, pH 6, 7, 8, 11에서도 최대근사치(최대활성의 70% 이상)를 보였다. 한편, Tris-HCl 버퍼를 pH 7, 8, 9에서 사용했을 때, 동일한 pH에 대해 다른 버퍼 종류를 사용했을 때보다 훨씬 활성이 낮았는데, 이는 Tris가 효소의 저해제로 작용할 수 있음을 시사하며 이로써 본 효소를 연구하거나 응용할 때 Tris 버퍼는 피해야 함을 암시한다(도 5b).
- [93] 3) 금속 이온 효과: 일반적으로 당 이성화효소는 금속이온을 보조인자로 필요로 한다. 따라서 본 발명에서도 여러 금속이온이 *RdFucI*의 활성에 끼치는 영향을 연구하였다(표 1). 결과적으로, Mn²⁺의 존재 하에서 효소의 활성은 7배 가량 증진되었다.
- [94]

[표1]

금속 이온의 효과

금속 이온	상대 활성(%)
대조군	100 ± 3
EDTA	77 ± 12
MnCl ₂	738 ± 70
MgCl ₂	533 ± 31
CoCl ₂	353 ± 83
CdCl ₂	183 ± 9
ZnCl ₂	159 ± 4
CsCl ₂	101 ± 16
LiSO ₄	101 ± 15
NiCl ₂	91 ± 13
FeCl ₃	74 ± 3
CaCl ₂	64 ± 8
CuCl ₂	58 ± 7

[95] <실시예 4> **Rd FucI**의 기질 특이성

[96] 일반적으로 당 이성화효소는 다양한 당들에 대하여 반응성을 보인다. 여러 알도오스((L-퓨코스, D-아라비노스, D-알트로스, D-갈락토스, D-만노스 및 D-글루코스) 및 케토오스 기질(L-푸쿨로스, D-리불로스, D-프시코스, D-타가토스 및 D-프룩토스)을 가지고 시험해 본 결과, L-푸쿨로스(115.3U/mg)와 D-리불로스(127.3U/mg)에 대하여 가장 높은 활성을 보였으며, 이는 시험한 알도오스 및 케토오스 기질 통틀어 훨씬 높은 활성을 보인 것이다. 또한, L-푸쿨로스와 D-리불로스의 경우에만, **RdFucI**가 알도오스 기질보다 케토오스 기질에 대하여 훨씬 우세한 반응을 보였다(도 6).

[97] <실시예 5> **Rd FucI**의 결정화 및 데이터 수집

[98] 결정 스크리닝은 시판 키트인 Index HT, Salt RX HT, Crystal Screen HT을 사용하여 20°C에서 시딩 드롭 증기 확산법으로 진행하였다. 0.1M HEPES(pH7.5), 20%(w/v) 폴리에틸렌글리콜 10,000이 포함된 용액에서 마이크로크리스탈이 1차로 생성되었다. 고결리티의 결정이 동일한 용액에서 행잉 드랍법으로 얻어졌다. 결정을 추가의 20%(v/v) 글리세롤을 함유하는 저장 기 용액에 담그고 질소 스트림에서 플래시 냉각시켰다. 결정에 대한 X-선 회절 데이터 세트는 Pilatus 6M을 사용하여 PLS-II의 빔라인 11C에서 또는 ADSC Quantum Q270 CCD 검출기를 사용하여 빔라인 6A에서 100K에서 수집되었습니다. 회절 데이터는

HKL2000 프로그램을 사용하여 처리되었다.

[99] <실시예 6> **Rd FucI**의 전체적인 구조

[100] phase는 검색 모델로 *EcFucI* (PDB 코드 : 1FUI)의 결정 구조를 사용하여 MOLREP에서 구현된 분자 대체 방법을 사용하여 해결되었다. 구조는 COOT를 사용하여 수동으로 재구성 및 정제되었다. 구조적 정제는 phenix.refine program PHENIX을 사용하여 수행되었다. 구조 품질은 MolProbity를 사용하여 검증되었다.

[101] 단량체 *RdFucI*는 N1, N2 및 C 도메인을 포함하는 19개의 α -나선과 23개의 β -가닥으로 이루어져 있다(도 7a). N1 도메인(Ser5-Met172)은 α/β -폴드를 채택하고 *RdFucI*의 6량체 형성의 기질 인식에 관여한다. N2 도메인(Lys173-Leu352) 및 C 도메인(Thr353-Arg591)은 촉매 활성화와 관련된 금속 결합 잔기를 포함한다(도 7a). *RdFucI* 서브 유닛은 삼량체의 이량체에 D3h 가상 대칭성을 이루고 있다.

[102] <실시예 7> 구조 기반 **Rd FucI**의 활성 부위 및 결합 자리 규명

[103] 기질 결합 포켓은 서브 유닛 A의 N2 및 C 도메인과 서브 유닛 B의 N1 도메인에 의해 형성되며(도 8a-c), 호모헥사머(homohexameric) *RdFucI*에서 총 6개의 기질 결합 부위를 갖는다. 기관이 접근하는 기관 결합 포켓의 입구는 약 $11 \times 12.5 \text{ \AA}$ 이다(도 8a). 금속 결합 부위가 형성되는 기관 결합 포켓은 약 $4 \times 5 \text{ \AA}$ 의 음으로 하전된 표면을 갖는다(도 8b). 금속 결합 부위와 기질 결합 포켓 사이의 거리는 $\sim 16.7 \text{ \AA}$ 이며(도 8d), 이것은 활성 센터가 주머니 깊숙이 자리 잡고 있음을 의미한다. 이것은 기관의 개방형 및 환형 모두 활성 부위 중심에 접근 가능하다는 것을 나타내며, 반면에 벌크 사카라이드는 기질 결합 포켓 내부에 존재하는 활성 부위에 접근할 수 없다는 것을 나타낸다.

[104] <실시예 8> 구조적 비교를 통한 **Rd FucI**의 특이성 파악

[105] DALI 서버를 이용하여 *RdFucI*가 대장균(*Escherichia coli*)의 L-FucIs(*EcFucI*, PDB code 1FUI, Z score : 60.6, 587C α s의 경우 rmsd : 0.3), *Aeribacillus pallidus*(*ApFucI*, 3A9R, Z 점수 : 56.6, 580C α s의 경우 rmsd : 0.7), *Streptococcus pneumoniae*(*SpFucI*, 4C20, Z 점수 : 55.9, rmsd : 585 C α s의 경우 0.7). 기질 결합 포켓의 중첩은 기질 인식 잔기(Arg16, W88, Gln300, Tyr437, Trp496 및 Asn524)가 경미한 입체 구조를 나타내는 반면, 금속 결합 잔기 Glu337, Asp361, His528(*RdFucI*에서 번호 매김)이 다른 단백질과 위치적으로 동일하다는 것을 보여준다. 반면, 기질 결합 포켓의 표면 상에 놓인 각 L-FucI의 $\alpha 7$ - $\alpha 8$ 루프는 상이한 형태를 갖는다. L-FucI의 서열 정렬은 높은 유사성을 나타내지만, 각 L-FucI의 $\alpha 7$ - $\alpha 8$ 루프에 대한 서열은 매우 다양하다(도 9b). $\alpha 7$ - $\alpha 8$ 루프가 기질 결합 포켓의 구조 형성에 관여하기 때문에 각 L-FucI는 독특한 기질 결합 포켓을 형성한다(도 9c). L-FucI는 일반적으로 금속 결합 부위 주위에 음으로 하전된 표면을 가지지만, 기질 결합 포켓의 표면은 상이한 전하 상태를 나타낸다(도 9c). 결과적으로, $\alpha 7$ - $\alpha 8$ 루프 구조의 차이는 L-FucI의 기질 특이성에 차이를 야기할 것이다.

산업상 이용가능성

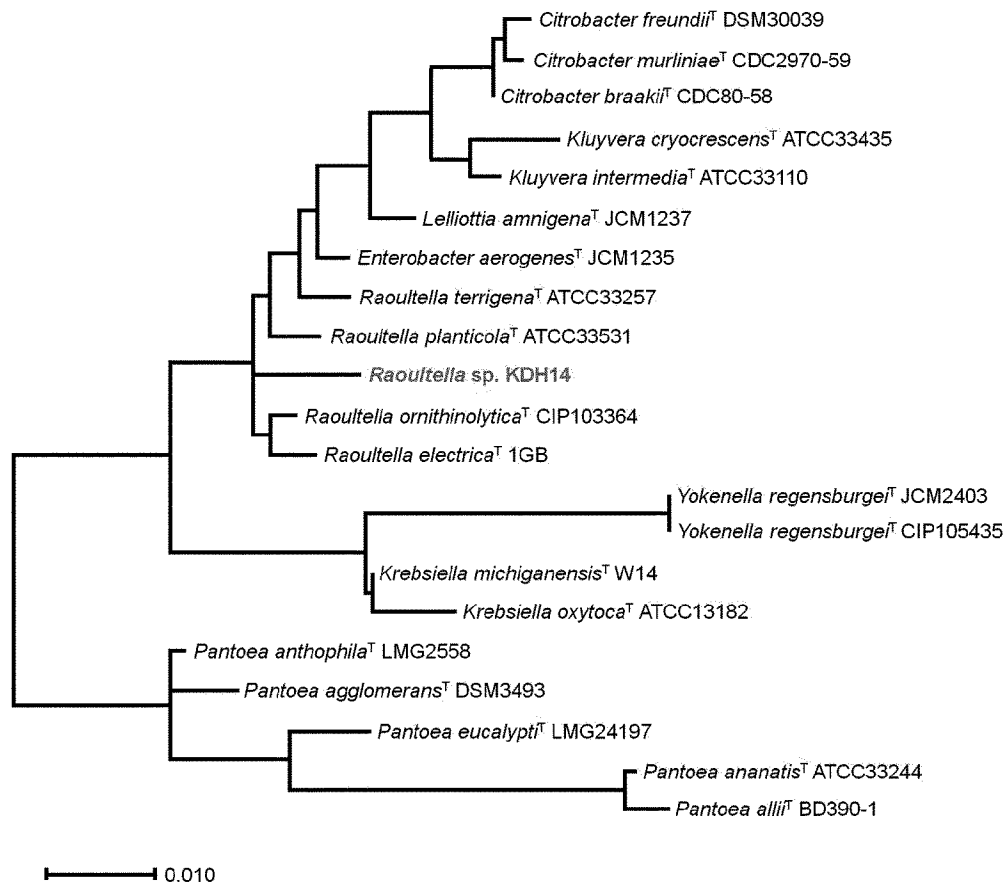
[106] 본 발명의 L-푸코스 이성화효소는 L-푸코스의 생산 분야에 적용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 이루어지고, L-푸코스 및 L-푸쿨로스 간의 가역반응에서 L-푸쿨로스에서 L-푸코스로의 전환 반응을 선호하는 L-푸코스 이성화효소(L-fucose isomerase).
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
L-푸코스 이성화효소는 라울텔라 종(*Raoultella* sp.) KDH 14 균주에서 유래하는, L-푸코스 이성화효소.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
L-푸코스 이성화효소는 Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 금속 이온에 의해 활성이 증가되는 것인, L-푸코스 이성화효소.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
L-푸코스 이성화효소는 Fe^{2+} , Ca^{2+} 및 Cu^{2+} 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 금속 이온에 의해 활성이 저해되는 것인, L-푸코스 이성화효소.
- [청구항 5] 제1항의 L-푸코스 이성화효소를 코딩하는 핵산 분자.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
핵산 분자는 SEQ ID NO: 2의 염기 서열로 이루어진 것인, 핵산 분자.
- [청구항 7] 제6항의 핵산 분자를 포함하는 제조합 벡터.
- [청구항 8] 제7항의 제조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.
- [청구항 9] 제8항의 숙주세포를 배양하여 L-푸코스 이성화효소를 발현하는 단계; 및 상기 발현된 L-푸코스 이성화효소를 회수하는 단계를 포함하는 L-푸코스 이성화효소의 제조방법.
- [청구항 10] 제1항의 L-푸코스 이성화효소; 및
L-푸쿨로스 및 D-리불로스로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 기질을 포함하는 L-푸코스 생산용 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
조성물은 Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 금속 이온을 더 포함하는, L-푸코스 생산용 조성물.
- [청구항 12] 제1항의 L-푸코스 이성화효소를, L-푸쿨로스 및 D-리불로스로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 기질과 반응시키는 단계를 포함하는 L-푸코스의 생산방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
반응은 30 내지 50 °C, pH 6 내지 11의 조건에서 5분 내지 1 시간 동안 수행하는 것인, L-푸코스의 생산방법.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
반응은 Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} 및 Zn^{2+} 로 이루어진 군에서 선택된 하나

이상의 금속 이온 하에서 수행되는, L-푸코스의 생산방법.

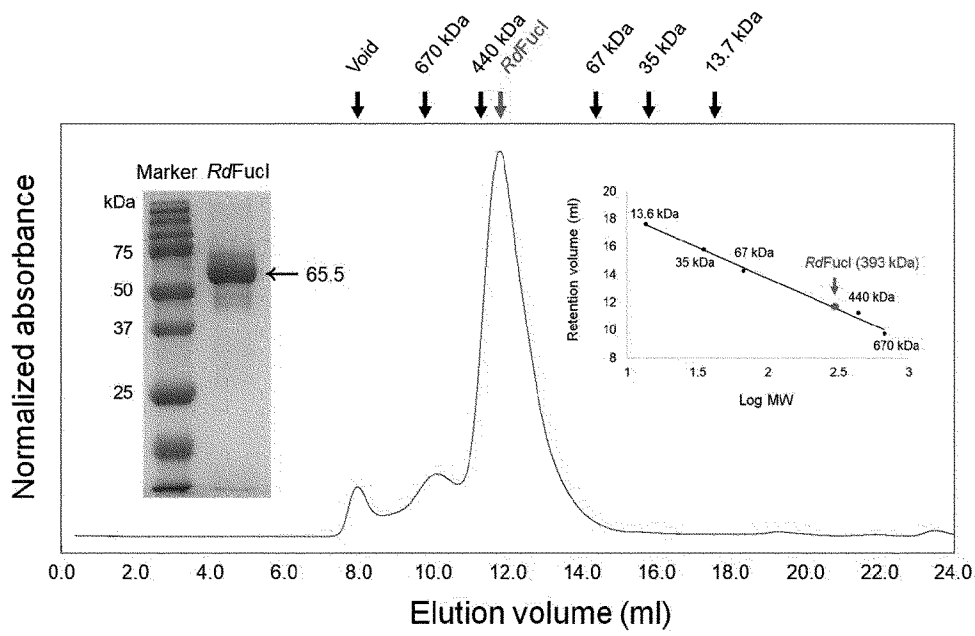
[도1]



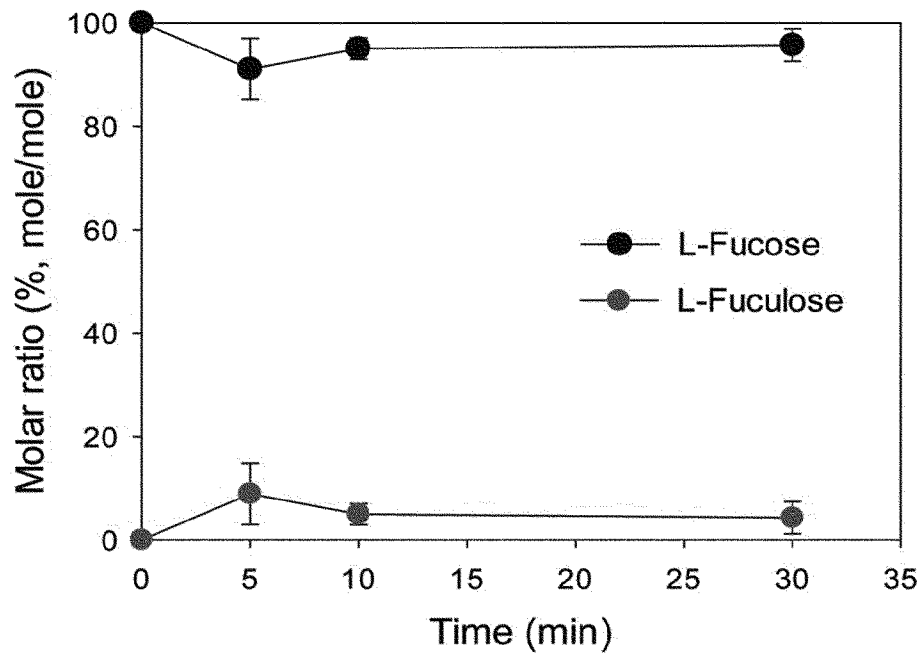
[도2]

ATGAAAAGAATCAGCTTACCAAAAATTGGTATTCGCCCGGTGATTGACGGACGTCGGATGG
 GGGTACGCGAGTCGCTGGAAGCGCAGACCATGAATATGGCAAAAGCCACCGCCGCTGA
 TTAGCGAGAAGCTCCGTCATGCTGCGGCGCGCAGATCGAGTCGCTGATTGCCGACACCTG
 CATCGCCGGTATGGCGGAATCCGCGCCTGTGAGGAGAAGTTACGCCGCGAGAACGTCGG
 CGTGACGATCACCGTCACCCCTTGCTGGTGCTACGGCAGCGAAACCATCGACATGGATCCG
 CTGCGCCCGAAGGCCATCTGGGGATTTAACGGCACGGAGCGCCCCGGCGCCGTCTATCTGG
 CCGCGCGCTGGCGCCACAGTCAGAAAGGGATCCCGGCTTCTCGATCTACGGCCATGAT
 GTCCAGGATGCCGACGACACCATCCCTGCCGACGTTGAGGAAAAGCTGCTGCGTTTTG
 CCGCGCCGGGCTTGGCGTTGCCAGTATGAAAGGGAAAAGCTATCTCTCCGTGGGGGGCGT
 TTCGATGGGCATCGCTGGCTCCATCGTCGACCATACTCTTTGAATCCTGGCTGGGGATGA
 AGGTCCAGGCGGTTGATATGACCGAACTGCGCCGCGCATCGACCAGAAAATCTATGATGA
 AGTTGAGCTGAAATGGCGCTGGCTGGCGGACAAAACTCCGCTACGGCGAGGACCA
 GAACGCGCAGCACTATAAGCGCGATGAAGAACAGAGCCGCGCGTGCTGAAAGAGAGCCT
 GCTGATGGCGATGTGATTGCGGACATGATGCAGGCAACGAGAACTGGCAGAAAAAGG
 GCTGCTCGAGGAGTCGCTGGGCTACAACGCCATCGCCGCGGCTTCCAGGGCCAGCGCCACT
 GGACCGATCAATACCGAACGGTGACACCGCGGAGGCGCTGCTCAACAGCTCCTTCGACTGG
 AACGGCGTGCGTGAGCCTTTTGTCTGCCACCGAGAACGACAGCCTCAACGGGGTAGCGAT
 GCTGATGGCCACCAGTTGACCGGTACCGCGCAGGTGTTGCCGACGTGCGCACTACTGGTC
 GCCGATGCGGTTGAGCGGGTGACCGGTACCGGCTACCGGGCTGGCGGAACATGGCATT
 TTCACCTGATTAATCGGGCTCCGCGCGCTGGACGGCTCCTGCCAACGCGGATGAAGAA
 GGTAACCAACGATGAAACCGCACTGGGAGATTTCCGAGAAAGAGGCGGATGCCTGCCTGGC
 GGCAACCGAATGGTGTCGGCGGATTATGAATACTTCCGCGCGCGCGGCTACTCTTCGCGCTT
 CCTGACCGAAGGCGGCTGCCGTTTACCATGACCGCGTCAACCTCATCAAAGGTCTGGGGCC
 GGTGCTGCAAAATGCGGAAGGCTGGAGCGTCGAGCTGCCAAAAGCGATGCACGACGAGCTGG
 ATGCCCGCAACCTCCAGTGGCCACCACTGGTTTCCCGCGCGCTACCGGCAAGGCC
 CGTTTGGCGACGTCTATTCGGTGATGGCCAACTGGGGGGTAAACCATGGCGTGCTGAATATCG
 GCCACGTGCGCGTGAATTTATACCTCGCGGCCATGCTGCGGATCCCGGTCTGCATGCATA
 ACGTGAAGAGGGGCAAACTACCGGCCATCCAGCTGGTCCGCCACGGCATGGATACGGAA
 GGCCAGGATTATCGCGCTGTCAAGAACTACGGCCCGCTGTATAAACGTTAA

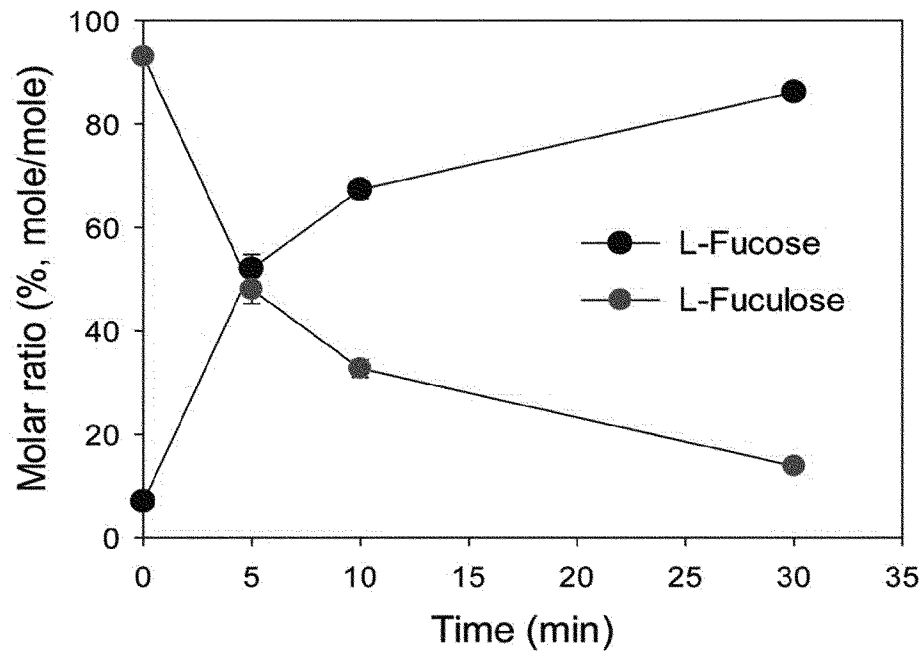
[도3]



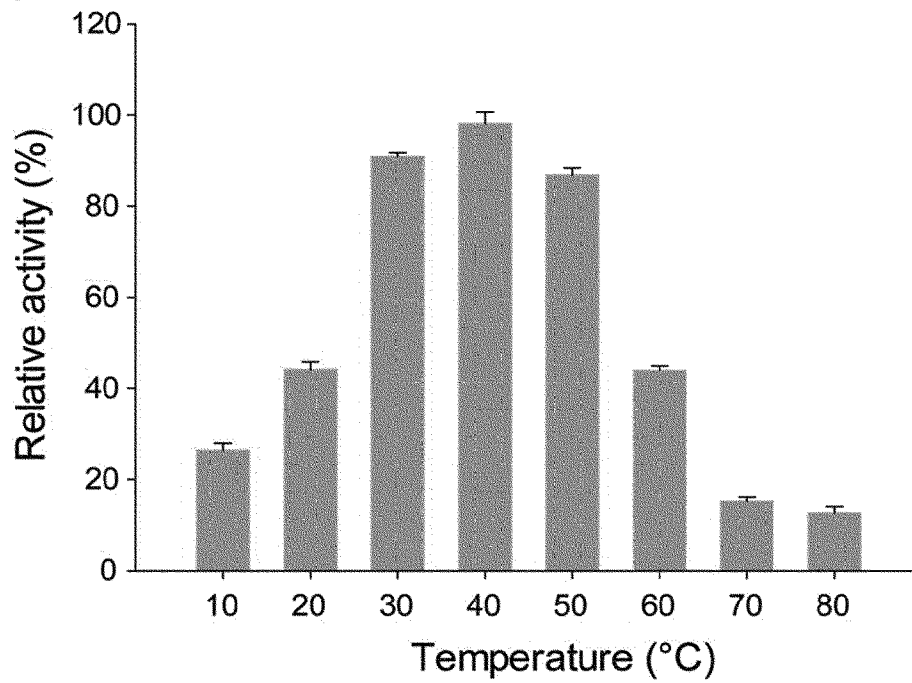
[도4a]



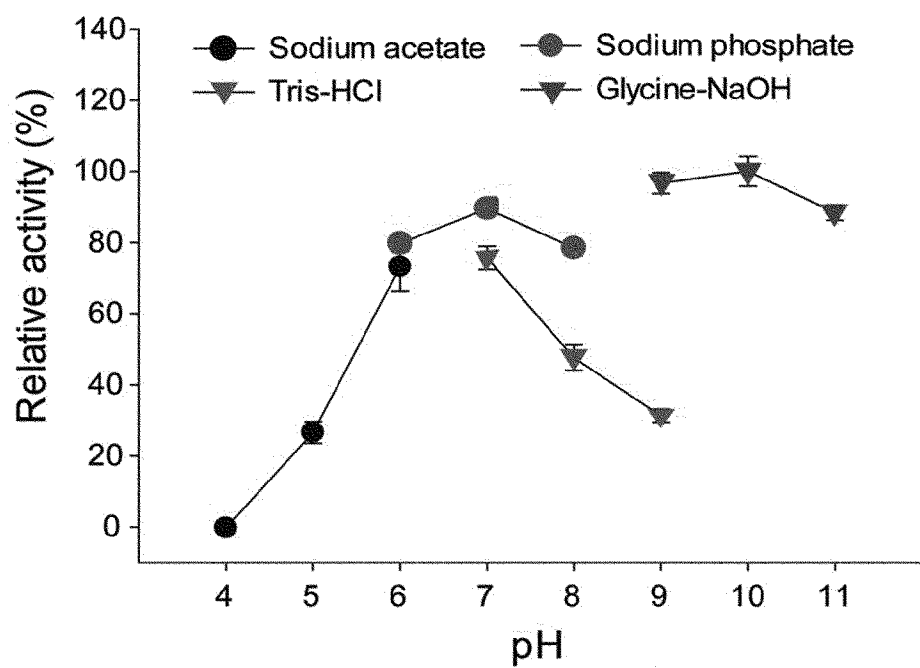
[도4b]



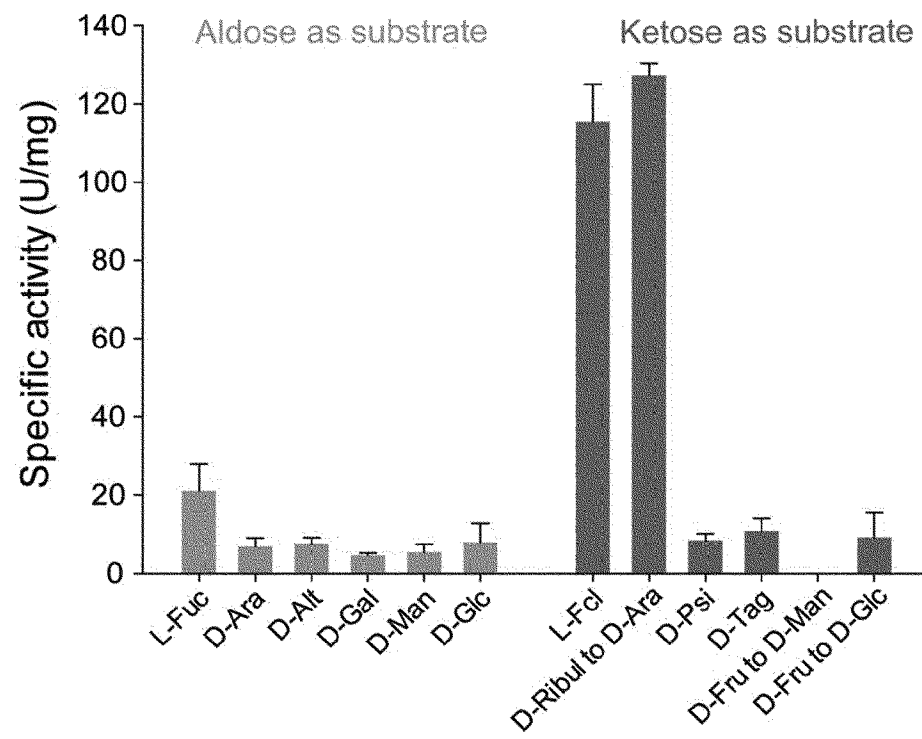
[도5a]



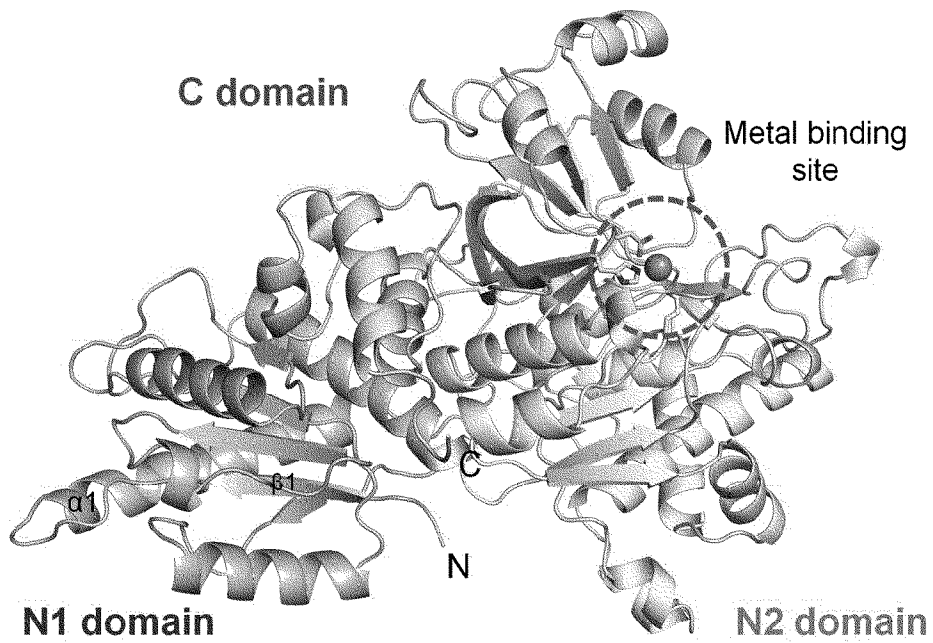
[도5b]



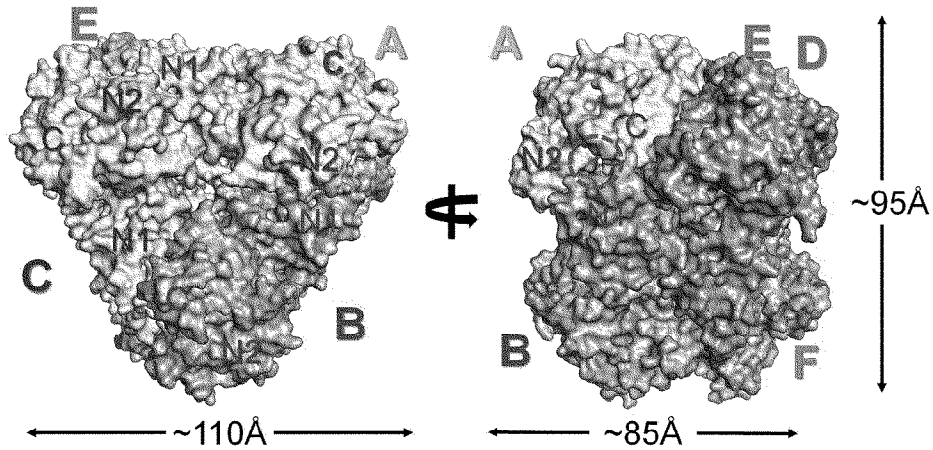
[도6]



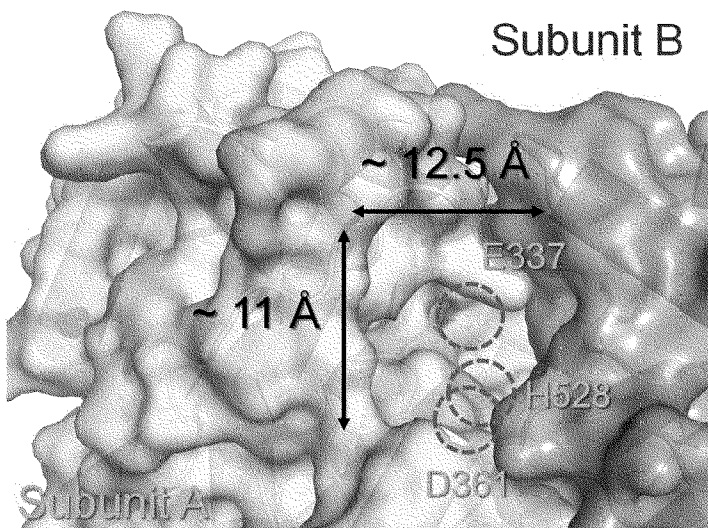
[도7a]



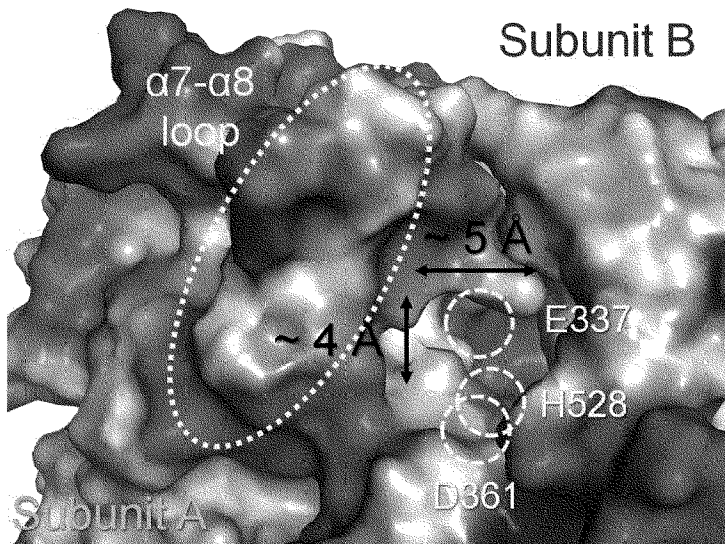
[도7b]



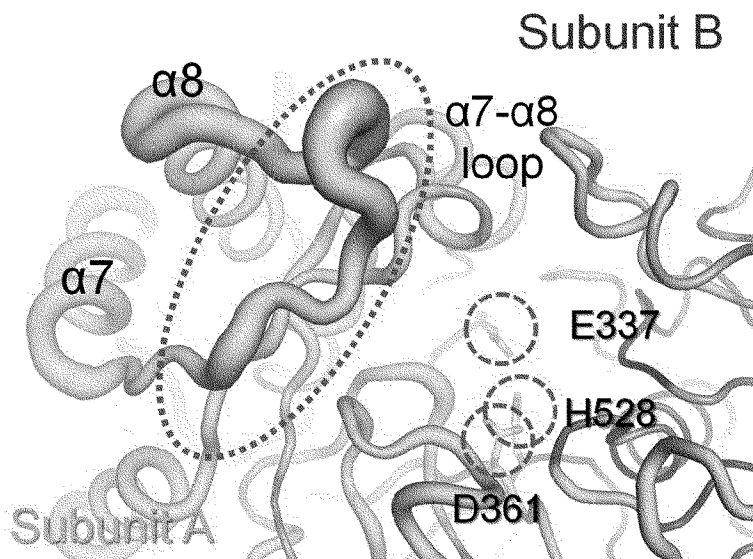
[도8a]



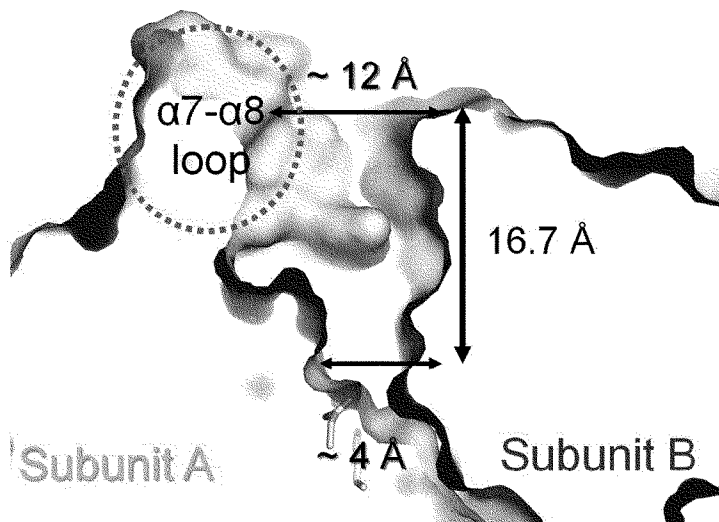
[도8b]



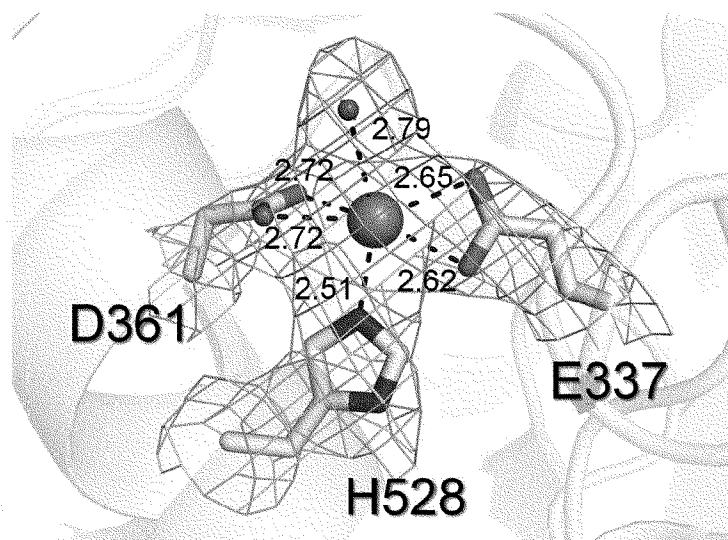
[도8c]



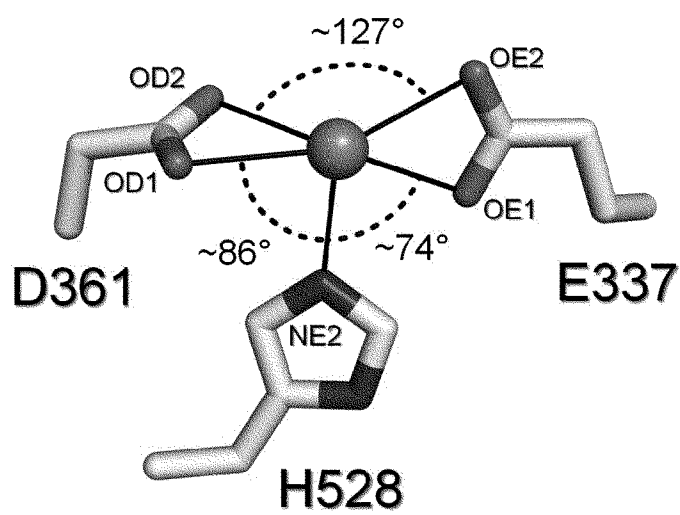
[도8d]



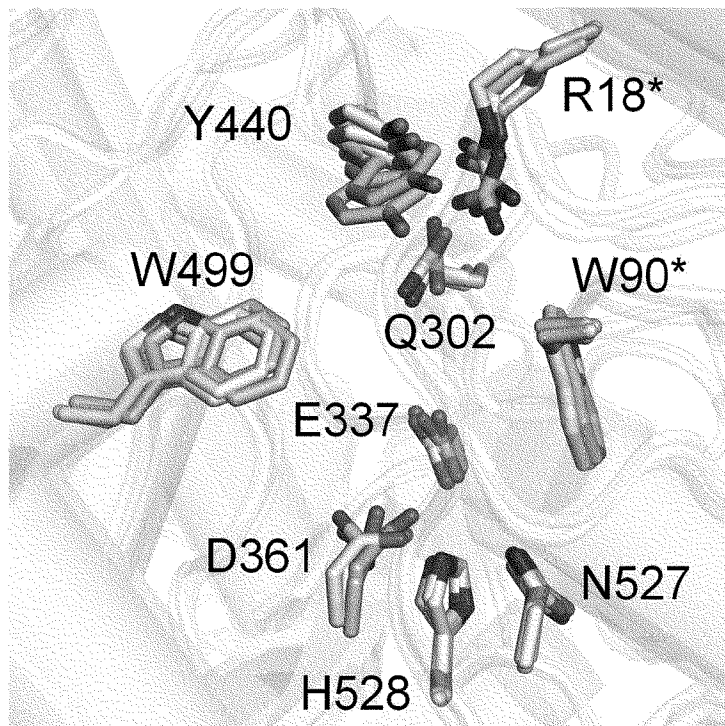
[도8e]



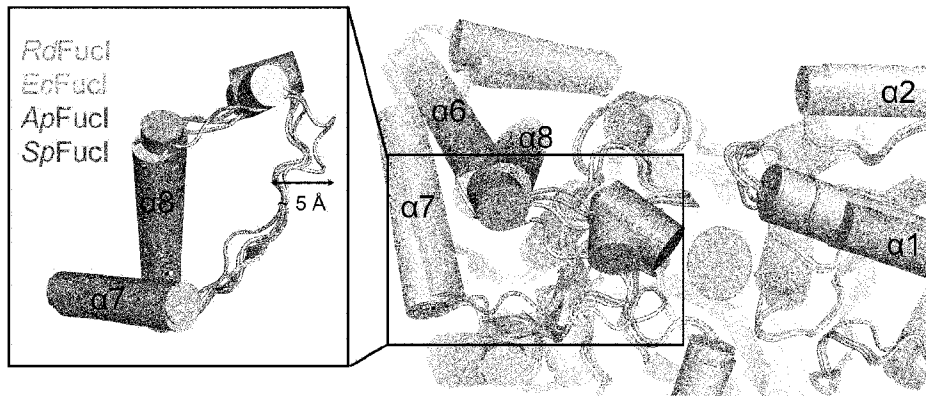
[도8f]



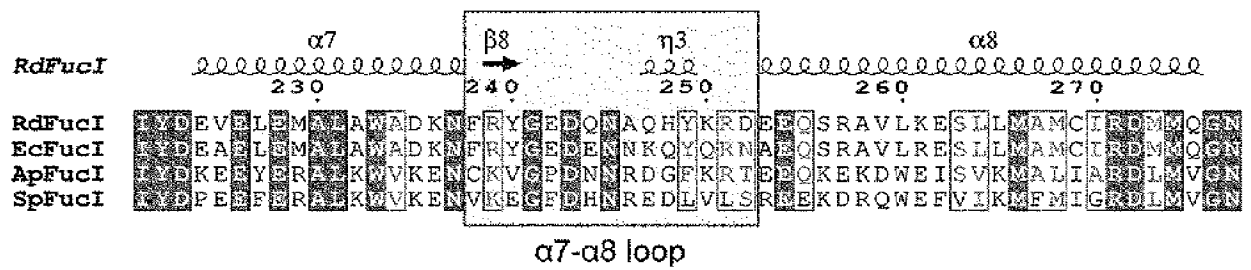
[도9a]



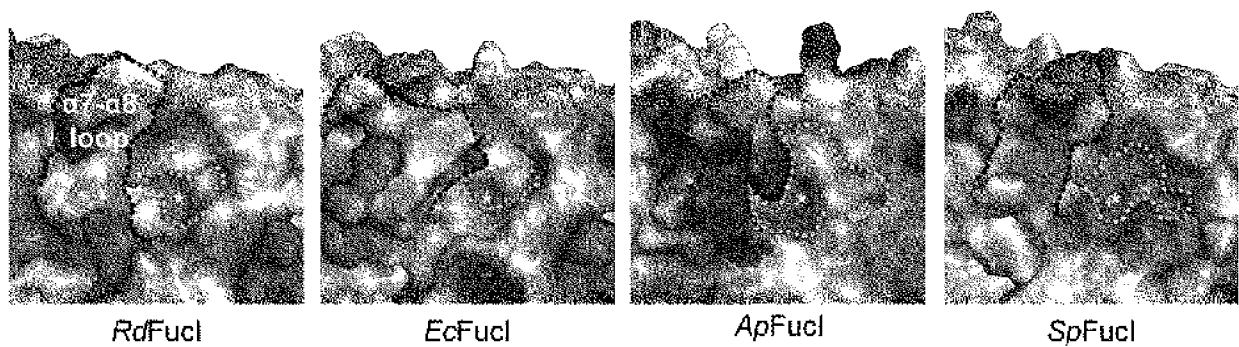
[도9b]



[도9c]



[도9d]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/011336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/90(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12P 19/02(2006.01)i; C12P 19/24(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 9/90(2006.01); C12N 15/52(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 푸코스 이성화효소 (L-fucose isomerase), 라울텔라 (Raoultella), L-푸코스 (L-fucose), L-푸쿨로스 (L-fuculose)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	NCBI. GenBank accession no. WP_104896882.1. L-fucose isomerase [Enterobacteriaceae]. 01 June 2019. See entire document.	1-4 5-14
Y	KR 10-2018-0026820 A (SILLA UNIVERSITY) 14 March 2018 (2018-03-14) See abstract; and paragraphs [0080]-[0092].	5-9
Y	JU, Y.-H. et al. Characterization of a recombinant L-fucose isomerase from Caldicellulosiruptor saccharolyticus that isomerizes L-fucose, D-arabinose, D-altrose, and L-galactose. Biotechnology letters. 2010, vol. 32, pp. 299-304. See abstract; experimental methods, pages 301-302; and table 1.	10-14
A	GREEN, M. et al. Enzymatic conversion of L-fucose to L-fuculose. Journal of Biological Chemistry. 1956, vol. 219, no. 2, pp. 557-568. See abstract; page 566; and figure 5.	1-14
A	NCBI. GenBank accession no. CP004142.1. Raoultella ornithinolytica B6, complete genome. 31 January 2014. See entire document.	1-14
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 November 2020		Date of mailing of the international search report 30 November 2020
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/011336

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2018-0026820 A	14 March 2018	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 9/90(2006.01)i; C12N 15/52(2006.01)i; C12P 19/02(2006.01)i; C12P 19/24(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 9/90(2006.01); C12N 15/52(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 퓨코스 이성화효소 (L-fucose isomerase), 라울텔라 (Raoultella), L-퓨코스 (L-fucose), L-푸쿨로스 (L-fuculose)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	NCBI, GenBank accession no. WP_104896882.1, 'L-fucose isomerase [Enterobacteriaceae]', 2019.06.01 전체 문헌	1-4 5-14
Y	KR 10-2018-0026820 A (신라대학교 산학협력단) 2018.03.14 요약; 단락 [0080]-[0092]	5-9
Y	JU, Y.-H. 등, 'Characterization of a recombinant L-fucose isomerase from Caldicellulosiruptor saccharolyticus that isomerizes L-fucose, D-arabinose, D-altrose, and L-galactose', Biotechnology letters, 2010, 32권, 페이지 299-304 초록; 실험 방법, 페이지 301-302; 표 1	10-14
A	GREEN, M. 등, 'Enzymatic conversion of L-fucose to L-fuculose', Journal of Biological Chemistry, 1956, 219권, 2호, 페이지 557-568 초록; 페이지 566; 도면 5	1-14
A	NCBI, GenBank accession no. CP004142.1, 'Raoultella ornithinolytica B6, complete genome', 2014.01.31 전체 문헌	1-14
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2020년11월30일(30.11.2020)		국제조사보고서 발송일 2020년11월30일(30.11.2020)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0026820 A	2018/03/14	없음	