(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 6 월 1 일 (01.06.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/096197 A1

(51) 국제특허분류:
C12P 19/12 (2006.01) *C12N 9/10* (2006.01)
C12N 15/77 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01) *C12N 9/04* (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/016912

(22) 국제출원일: 2022 년 11 월 1 일 (01.11.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0163686 2021 년 11 월 24 일 (24.11.2021) KR

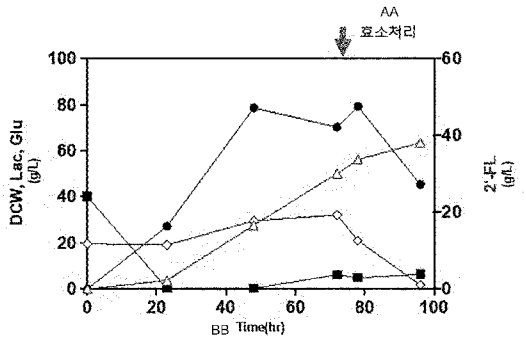
(71) 출원인: (주)에이피테크놀로지 (**ADVANCED PROTEIN TECHNOLOGIES CORP.**) [KR/KR]; 16229 경기도 수원시 영통구 광교로 147, 7층, Gyeonggi-do (KR). 서울대학교 산학협력단 (**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION**) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 신철수 (**SHIN, Chul Soo**); 16563 경기도 수원시 권선구 권중로 31, 303동 502호, Gyeonggi-do (KR). 윤종원 (**YOON, Jong Won**); 13525 경기도 성남시 분당구 동판교로 155, 706동 702호, Gyeonggi-do (KR). 송영하 (**SONG, Young Ha**); 16961 경기도 용인시 기흥구 기흥로 116번길 100, 206동 201호, Gyeonggi-do (KR). 유종길 (**YOO, Jong Gil**); 16316 경기도 수원시 장안구 정자천로 188번길 64 304동 701호, Gyeonggi-do (KR). 유영선 (**YOO, Young Sun**); 18422 경기도 화성시 여울로4길 37-20, 202호, Gyeonggi-do (KR). 이헌학 (**LEE, Heon Hak**); 18032 경기도 평택시 상서재로50, 401동 2101호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인태동 (**TAEDONG PATENT & LAW FIRM**); 08302 서울특별시 구로구 가마산로 282, 302호, Seoul (KR).

(54) **Title:** METHOD FOR INCREASING PRODUCTIVITY OF 2'-FUCOSYLLACTOSE THROUGH ENZYME TREATMENT

(54) **발명의 명칭:** 효소 처리를 통한 2'-푸코실락토오스의 생산성 증대 방법



CC DD

BB Time(hr)	DCW	2'-FL	Lactose	Glucose	Etc	EE
0	0.00	0.00	19.70	40.10		
23	27.16	2.30	19.10	0.30		
48	78.72	16.60	29.60	0.30		
72	70.32	30.10	32.20	6.20	Lactase투입	
78	79.32	33.70	21.00	4.90		
96	45.36	38.10	1.80	6.40		

AA ... Enzyme treatment
BB ... Time
CC ... Lactose
DD ... Glucose
EE ... Introduction of lactase

(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for increasing the productivity of 2'-fucosyllactose (2'-FL) through an enzyme treatment, wherein lactose, which is used as a substrate in the latter half of a culture stationary phase, is treated with a small amount of enzyme and thereby decomposed, the glucose obtained as a result is consumed to produce guanosine diphosphate-L-fucose, which is a precursor of 2'-fucosyllactose, and the lactose remaining in a later phase of the culture can be maximally utilized in the production of 2'-fucosyllactose. Thus, by-products are minimized and there is no need for additional glucose, thus enabling the productivity of 2'-fucosyllactose to be increased from an economic perspective.

WO 2023/096197 A1

[다음 쪽 계속]

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, CV, 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, ME, 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))

(57) 요약서: 본 발명은 효소 처리를 통한 2'- 푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose, 2'-FL) 의 생산성 증대 방법에 관한 것으로, 배양 정지기 후반부에서 기질로 사용되는 유당에 소량의 효소를 처리하여 이를 분해하고, 이로부터 얻어진 포도당을 소비하여 2'- 푸코실락토오스의 전구체인 구아노신이인산-L- 푸코스를 생산하고, 배양 후기 잔존하는 유당을 2'-푸코실락토오스의 생산에 최대한 활용할 수 있다. 이를 통해 부산물을 최소화하면서도 추가적인 포도당을 필요로 하지 않아 경제적으로 2'-푸코실락토오스의 생산성을 증대시킬 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 효소 처리를 통한 2'-푸코실락토오스의 생산성 증대 방법

기술분야

[1] 본 발명은 효소 처리를 통한 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose, 2'-FL)의 생산성 증대 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 기질인 유당 (lactose)을 기반으로 효소 처리를 하여 추가 배지 없이 2'-푸코실락토오스의 생산성을 증대시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 모유올리고당 (Human milk oligosaccharides, HMOs)은 모유에 함유되어 있는 올리고당으로, 유당 및 지방 다음으로 모유에서 세 번째로 많은 성분이다. 모유올리고당의 종류는 약 200여종으로 다양하며, 면역 기능을 강화시키거나, 아이의 발달과 행동에 좋은 영향을 주는 등의 다양한 이점을 가진다.

[3] 주요 HMO 중 가장 많은 양으로 존재하는 2'-푸코실락토오스는 다양한 생물학적 활성에 관여한다. 기존 연구에서 2'-푸코실락토오스를 생산하는 방법은 직접 모유로부터 추출하는 방법과 화학적 또는 효소적 방법으로 추출하는 방법이 있다. 하지만 직접 모유로부터 추출하는 방법은 비윤리적이라는 것과, 모유 수급이 제한적이고 낮은 생산성이라는 문제가 있다. 또한, 화학적 합성법은 고가의 기질, 낮은 이성체 선택성과 생산수율, 그리고 독성시약의 사용 등의 문제가 있고, 효소적 합성법은 전구체가 되는 GDP-L-푸코오스가 매우 고가라는 점과 푸코오스 전이효소의 정제비용이 많이 든다는 문제점이 있다.

[4] 이같은 문제를 해결하기 위한 해결책으로 미생물을 이용하는 2'-푸코실락토오스의 생산이 있으나, 종래의 기술은 대부분 재조합 대장균을 이용한 생산기술이었다. 하지만 이는 소비자들에게 해로운 균이라는 인식이 있으며, 대장균 세포의 경우 유당 투과효소 (Lactose permease)의 작용에 의해 유당 제한 배양상태에서 '락토오스 킬링 (Lactose killing)'이라는 대장균 세포가 사멸되는 현상(Daniel dykhuizen and daniel hartl, 1987, "Transport by the lactose permease of Escherichia coli as the basis of lactose killing", 10.1128/JB.135.3.876-882, 1978, Journal of bacteiology)이 나타나므로 사용하는 것이 다소 제한적이다. 이에 기존의 방법을 극복하면서 안전하고 경제적으로 2-푸코실락토오스의 생산성을 증대시키는 새로운 생산 방법이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 본 발명은 기질인 유당 (lactose)을 효소 처리로 분해함으로써 추가 배지 없이 경제적으로 2'-푸코실락토오스의 생산성을 증대시키는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

[6] 본 발명은 α-1,2-푸코오스 전이효소 (α-1,2-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 (GTPmannose-1-phosphate guanylyltransferase)를 보유하고 있는 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacteriumglutamicum*)을 락토오스가 첨가된 배지에 배양하여 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)를 생산함에 있어서, 배양 정지기 (stationary phase) 또는 사멸기 (death phase)에 유당분해효소를 배지에 투입하는 것을 특징으로 하는 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법을 제공한다.

[7] 한편, 본 발명의 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법에 있어서, 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰은, 바람직하게 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase)가 과발현되도록 형질전환되고, GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)가 과발현되도록 형질전환된 것이 좋다.

[8] 한편, 본 발명의 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법에 있어서, 상기 배지는, 바람직하게 글루코오스를 포함하고 있는 것일 수 있다.

[9] 한편, 본 발명의 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법에 있어서, 상기 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법은, 바람직하게 포도당 또는 락토오스를 배양 중에 추가로 공급하는 유가식 배양으로 수행하는 것일 수 있다.

[10] 한편, 본 발명의 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법에 있어서, 상기 유당분해효소는, 바람직하게 배양 정지기 (stationary phase)에서 사멸기 (death phase)로 전환되는 시점에 배지에 투입하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[11] 본 발명에서는 배양 정지기 후반부에서 기질로 사용되는 유당에 소량의 효소를 처리하여 이를 분해하고, 이로부터 얻어진 포도당을 소비하여 2'-푸코실락토오스의 전구체인 구아노신이인산-L-푸코스를 생산하고, 배양 후기 잔존하는 유당을 2'-푸코실락토오스의 생산에 최대한 활용할 수 있다. 이를 통해 부산물을 최소화하면서도 추가적인 포도당을 필요로 하지 않아 경제적으로 2'-푸코실락토오스의 생산성을 증대시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[12] 도 1은 재조합 코리네박테리움 균주에 대한 2'-푸코실락토오스의 생산 경로를 나타낸 모식도를 나타낸 것이다.

[13] 도 2는 베타-갈락토시다아제에 의한 유당 분해를 나타낸 모식도이다.

[14] 도 3은 유당 분해를 통한 2'-푸코실락토오스의 생산성을 나타낸 결과 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[15] 주요 모유올리고당 중 하나인 2'-푸코실락토오스는 다양한 생물학적 활성에 관여하는 등의 건강 기능적 이점을 가지므로 이를 생산하는 방법에 대한 다양한 방법이 시도되고 있다. 하지만 기존의 직접 모유에서부터 추출하는 방법이나, 화학적, 효소적 합성법은 낮은 생산성, 고가의 비용, 낮은 생산수율, 독성 등의 문제가 있어 대체하기 위한 방법이 필요하다.

[16] 이를 위해 미생물을 이용하는 생산 기술이 제안되었으나 대부분 재조합 대장균을 이용한 기술이며, 대장균 세포의 경우 유당투과효소(Lactose permease)의 작용에 의해 대장균 세포가 사멸되는 현상('락토오스 킬링')이 나타나므로 사용하는 것이 다소 제한적이다.

[17] 본 발명자들은 이전 등록특허 10-1731263호(등록일자: 2017.04.24)와 제10-2014925호(등록일자: 2019.08.21)에서 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacteriumglutamicum*)을 이용하여 2'-FL을 생산하는 기술에 대해 제안한 바가 있다.

[18] 다만, 본 발명자들은 추가적인 배지의 공급 없이 경제적으로 2'-푸코실락토오스의 생산성을 늘리기 위한 방법을 찾고자 다양한 실험적 시도를 하였고, 배양 정지기 또는 사멸기에 (바람직하게는 배양정지기에서 사멸기로 전환되는 구간) 유당분해효소를 처리함으로써 최종적인 2'-푸코실락토오스의 생산성을 더욱 늘리는 방법을 본 발명을 통해 개발한 것이다.

[19] 이에 본 발명은 α-1,2-푸코오스 전이효소 (α-1,2-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 (GTPmannose-1-phosphate guanylyltransferase)를 보유하고 있는 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacteriumglutamicum*)을 락토오스가 첨가된 배지에 배양하여 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)를 생산함에 있어서, 배양 정지기 (stationary phase) 또는 사멸기 (death phase)에 유당분해효소를 배지에 투입하는 것을 특징으로 하는 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법을 제공한다. 본 발명의 균주를 사용하여 2'-푸코실락토오스를 생산하는 경로는 도 1에 나타내었다.

[20] 한편, 본 발명에서 상기 유당분해효소는, 바람직하게

베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase)인 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 배양액 내에 잔류하는 유당(lactose)의 g당 효소 60~100 unit으로 처리하는 것이 좋다. 유당분해효소의 처리에 의해 유당이 분해되어 갈락토오스와 포도당이 생성된다. 생성된 포도당으로부터 2'-푸코실락토오스 합성반응의 최종 기질인 구아노신이인산-L-푸코오스 (GDP-L-fucose)가 생산되고, 분해되지 않은 유당과 반응하여 2'-푸코실락토오스가 추가로 생산되는 것이다. 이와 같은 과정을 통해 발효 후기에 부산물 (By-product)이 되는 유당을 최대한 활용하여 2'-푸코실락토오스의 생산량을 증가시킬수 있게 되는 것이다. 또한, 2'-푸코실락토오스의 분리 정제 과정에서 유당을 분리해야 하는 부담을 덜 수 있는 부가적인 효과도 발휘된다.

[21] 한편, 본 발명의 2'-푸코실락토오스의 생산방법에 있어서, 상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰은, 바람직하게 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase)가 과발현되도록 형질전환되고, GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)가 과발현되도록 형질전환된 것이 좋다. 코리네박테리움 글루타미쿰은 포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase, ManB), GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase, ManC)를 암호화하는 유전자를 자체적으로 보유하여 발현시킬 수 있기 때문에, 굳이 이 효소를 암호화하는 유전자를 도입시켜줄 필요는 없으나, 대량 생산을 위해서는 이 효소를 과발현시켜줄 필요가 있다. 따라서, 본 발명에서는 바람직하게 이들 두 효소를 과발현할수 있도록 코리네박테리움 글루타미쿰을 형질전환하는 것이 필요한 것이다.

[22] 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.

[23] 한편, 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법에 있어서, 상기 배지는, 바람직하게 글루코오스를 포함하고 있는 것일 수 있다. 이와 같이 추가 배지 성분을 더함으로써 균주의 생육이 활발해져 더욱 높은 생산성으로 2'-푸코실락토오스를 생산할 수 있다. 또한, 이를 위해서는 유가식 배양을 통해 글루토오스 또는 락토오스를 지속적으로 공급하면, 세포의 성장을 더욱 증대시키고, 고순도, 고수율, 고생산성으로 2'-푸코실락토오스를 생산할 수 있다. 유가식 배양에 관한 세부 지엽적 기술들은 당업계의 공지 기술을 사용할 수 있으므로, 이에 대해서는 그 기재를 생략하기로 한다.

[24] 한편, 본 발명의 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법에 있어서,

상기 유당분해효소는, 바람직하게 배양 정지기 (stationary phase)에서 사멸기 (death phase)로 전환되는 시점에 배지에 투입하는 것일 수 있다.

[25] 한편, 하기 실험에 의하면, 본 발명은 배양 정지기 구간 후반부에 유당 분해 효소인 베타 갈락토시다아제를 처리함으로써, 효소 처리전후와 비교할 때, 최종적으로 2'-푸코실락토오스를 126% 확보하는 수준으로 생산성을 크게 증대시킬 수 있음을 확인하였다. 이는 추가 배지의 투입이 없어 포도당으로부터 구아노신이인산-L-푸코스를 생산하지 못함에도 유당 분해로 얻어진 포도당 (Glucose)으로부터 2'-푸코실락토오스 합성반응의 최종 기질인 구아노신이인산-L-푸코스 (GDP-L-Fucose)가 생산되고, 이것이 분해되지 않은 유당과 반응하여 2'-푸코실락토오스가 생산된 것으로 해석할 수 있었다. 이를 통해 최종 생산된 2'-푸코실락토오스는 추가적인 포도당을 필요로 하지 않기에 경제적으로 도움이 될 수 있고, 잔존하는 유당만을 이용하여 2'-푸코실락토오스의 생산성을 높이면서 부산물로 존재하는 유당의 양을 최소화할 수 있다. 이와 같이 안전하고도 경제적인 2'-푸코실락토오스의 생산성 증대 방법을 제공할 수 있다.

[26] 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.

[27]

[28] **[제조예 1: 재조합 플라스미드의 제조]**

[29] 플라스미드 제작 및 2'-푸코실락토오스 (fucosyllactose, 2'-FL)의 생산을 위해 각각 대장균 (*Escherichia coli*) K-12 MG1655와 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032를 이용하였다.

[30] pFGW(Ps) 플라스미드를 구축하기 위해 대장균인 K-12 MG1655의 유전체 (genomic) DNA로부터 두 개의 DNA 프라이머(primer) GW-F 와 GW-R를 이용한 PCR 반응을 통해 gmd-wcaG 유전자 클러스터(cluster)를 증폭하고, 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032의 유전체 DNA로부터 두 개의 DNA 프라이머 Sod-F와 Sod-R를 이용한 PCR 반응을 통해 Sod 유전자의 프로모터를 증폭 한 후, 두 개의 DNA 프라이머 Sod-F와 GW-R를 이용하여 오버랩 (overlap) PCR 반응을 통해 pSod-Gmd-WcaG DNA 절편을 합성하였다.

[31] 또한, pXMJ19 플라스미드 (plasmid)로부터 두 개의 DNA 프라이머 Ter-F와 Ter-R를 이용한 PCR 반응을 통해 전사종결 서열을 증폭한 후, 상기 합성한 pSod-Gmd-WcaG와 전사종결 서열을 주형으로 두 개의 DNA 프라이머 Sod-F와 Ter-R를 이용한 PCR 반응을 통해 pSod-Gmd-WcaG-ter 서열을 합성한 후, 제한효소 BamHI으로 잘려진 pCES208 플라스미드에 이를 삽입하여 pGW 플라스미드를 구축하였다.

[32] 또한, 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 유전체 DNA로부터 두 개의

DNA 프라이머 Tuf-F1와 Tuf-R1를 이용한 PCR 반응을 통해 Tuf 유전자 프로모터를 증폭하고 합성된 슈도페도박터 살탄스 (*Pseudopedobacter saltans*) DSM 12145 유래 α-1,2-푸코오스 전이효소 (α-1,2-fucosyltransferase)로부터 두 개의 DNA 프라이머 FT(Ps)-F와 FT(Ps)-R를 이용한 PCR 반응을 통해 α-1,2-푸코오스 전이효소를 증폭한 후, 두 개의 프라이머 Tuf-F와 FT(Ps)-R를 이용하여 오버랩 (overlap) PCR 반응을 통해 pTuf-FT(Ps) DNA 절편을 합성하였다. 상기 구축된 pGW 플라스미드에 제한효소 NotI을 처리하여 pTuf-FT(Ps)를 삽입함으로써 pFGW(Ps) 플라스미드를 구축하였다.

[33] 한편, pXIL 플라스미드를 구축하기 위해, 대장균 K-12 MG1655의 유전체 DNA로부터 두 개의 DNA 프라이머 ilvC-lacY-F와 lacY pX-R을 이용한 PCR 반응을 통해 lacY 유전자를 증폭하고 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032의 유전체 DNA로부터 두 개의 DNA 프라이머 pX-ilvC-F와 ilvC-lacY-R을 이용한 PCR 반응을 통해 ilvC 유전자의 프로모터를 증폭한 후 두 개의 DNA 프라이머 pX-ilvC-F와 lacY pX-R을 이용하여 오버랩 (overlap) PCR 반응을 통해 pilvC-lacY DNA 절편을 합성한 후 제한효소 NotI과 EcoRI이 처리된 pX 플라스미드 (pXMJ19)에 이를 삽입하여 pXIL 플라스미드를 구축하였다.

[34] 본 제조예에서 사용한 균주(strain), 프라이머(primer), 플라스미드(plasmid), 핵산 및 아미노산 서열은 하기 표 1 내지 4에 기재하였다.

[35] [표1]

균주

E.Coli K-12 MG1655	F^-, $lambda^-$, rph-1
C. glutamicum	Wild-type strain, ATCC13032

[36] [표2]

핵산 및 아미노산 서열

gmd 핵산 서열	서열번호 1
wcaG 핵산 서열	서열번호 2
lacY 핵산 서열	서열번호 3
FT(Ps) 핵산 서열	서열번호 4
FT(Ps) 아미노산 서열	서열번호 5

[37] [표3]

프라이머

프라이머	서열 (5'→3')
pX-ilvC-F	GTCATATGATGGTCGCGGATCCGAATTCCCAGGCAAGCTCCGC
ilvC-lacY-R	GTTTTTTAAATAGTACATAATCTCGCCTTTCGTAAAAATTTTGGT
ilvC-lacY-F	TTACGAAAGGCGAGATTATGTACTATTTAAAAAACACAAACTTTTGGATGTTCGG
lacY pX-R	GCCTTTCGTTTTATTTGCTCGAGTGCGGCCGCTTAAGCGACTTCATTCACCTGACGAC
Tuf-F1	TGGAGCTCCACCGCGGTGGCTGGCCGTTACCCTGCGAA
Tuf-R1	CAAATATCATTGTATGTCCTCCTGGACTTCG
FT(ps)-F	AGGACATACAATGATATTTGTAACCGGATATG
FT(ps)-R	CGCTTCACTAGTTCTAGAGCTTAAATAATGTGTCGAAACAGATTC
Sod-F	TTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGAAGCGCCTCATCAGCG
Sod-R	TACACCGGTGATGAGAGCGACTTTTGACATGGTAAAAAATCCTTTCGTAGGTTTCCGCAC
GW-F	ATGTCAAAAGTCGCTCTCATCACCGGTGTA
GW-R	CAAGCTGAATTCTTACCCCCGAAAGCGGTC
ter-F	GACCGCTTTCGGGGGTAAGAATTCAGCTTG
ter-R	GGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGAAAAGGCCATCCGTCAGGAT

[38] [표4]

플라스미드

Plasmid	Related features	Ref.
pCES208	Km^R, *C.glutamicum/ E.coli shuttle vector*	J. Microbiol. Biotechnol. (2008), 18(4), 639647
pXMJ19	Cm^R, *C.glutamicum/ E.coli shuttle vector*	Biotechnology Techniques (1999), 13, 437441
pGW	pCES208 + Sod-gmd-wcaG	특허 제10-2014925호
pFGW(Ps)	pCES208 + Tuf-FT(Ps) + Sod-gmd-wcaG	특허 제10-2014925호
pXIL	pXMJ19 + ilvC-lacY	특허 제10-2014925호

[39]

[40] **[실시예 1: 유당분해효소 처리에 따른 2'-푸코실락토오스 생산성]**

[41] 본 실시예에서는 기질인 유당(lactose)을 효소 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase) 처리로 분해하여 추가배지 없이 2'-푸코실락토오스를 생산시키는 방법에 관한 실험이다.

[42] 배양을 위한 조건은 다음과 같다.

[43] - 종배지 조성: 10 g/L Yeast Extract, 20 g/L casein peptone, 10 g/L Sodium chloride, 5 g/L glucose

[44] - 메인배지 조성: 30 g/L Yeast Extract, 5 g/L Ammonium sulfate, 1 g/L Potassium phosphate, 1 g/L Potassium phosphate, 40 g/L glucose, 20 g/L Lactose

[45] - 추가배지 조성 : 15 g/L Ammonium sulfate, 600 g/L glucose, 100 g/L Lactose

[46] - 효소 : beta-galactosidase

[47] - 배양 조건 : pH 7.0, 800 rpm, 25℃, Air 2VVM

[48] 배양 정지기 (stationary phase) 구간 후반부에 추가 배지의 투입을 종료하고 잔존하는 유당을 측정하여 g당 효소 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase)를 80 unit으로 처리하였다. 도 2와 같이 효소 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase)에 의해서 유당이 분해되면 포도당과 갈락토오스가 생기게 된다.

[49] 그 결과, 도 3과 같이 추가 배지의 투입 없이 효소 처리전 30.1 g/L의 2'-푸코실락토오스가 생산되었고, 추가 배지의 투입이 없어 포도당으로부터 구아노신이인산-L-푸코스를 생산하지 못함에도 최종적으로 38.1 g/L의 2'-푸코실락토오스가 효소에 의한 유당 분해를 통해 생산됨을 확인하였다. 최종 생산된 2'-푸코실락토오스가 추가적인 포도당을 필요로 하지 않기에 경제적으로 도움이 될 수 있고, 잔존하는 유당만을 이용하여 2'-푸코실락토오스를 126% 획득할 수 있다.

[50] 이같은 결과는 유당 분해로 얻어진 포도당 (Glucose)으로부터 2'-푸코실락토오스 합성반응의 최종 기질인 구아노신이인산-L-푸코스 (GDP-L-Fucose)가 생산되고, 이것이 분해되지 않은 유당과 반응하여 2'-푸코실락토오스가 생산된 것으로 해석할 수 있었다. 또한, 유당을 유당분해효소 처리에 의해 최대한 활용하여 2'-푸코실락토오스를 추가적으로 더 생산함으로써, 최종적으로 부산물로 존재하는 유당의 양을 최소화하며 배양을 종료화시킬 수 있었다.

청구범위

[청구항 1] α-1,2-푸코오스 전이효소 (α-1,2-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 (GTPmannose-1-phosphate guanylyltransferase)를 보유하고 있는 것을 특징으로 하는 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*)을 락토오스가 첨가된 배지에 배양하여 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)를 생산함에 있어서,
배양 정지기 (stationary phase) 또는 사멸기 (death phase)에 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase)를 배지에 투입하는 것을 특징으로 하는 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법.

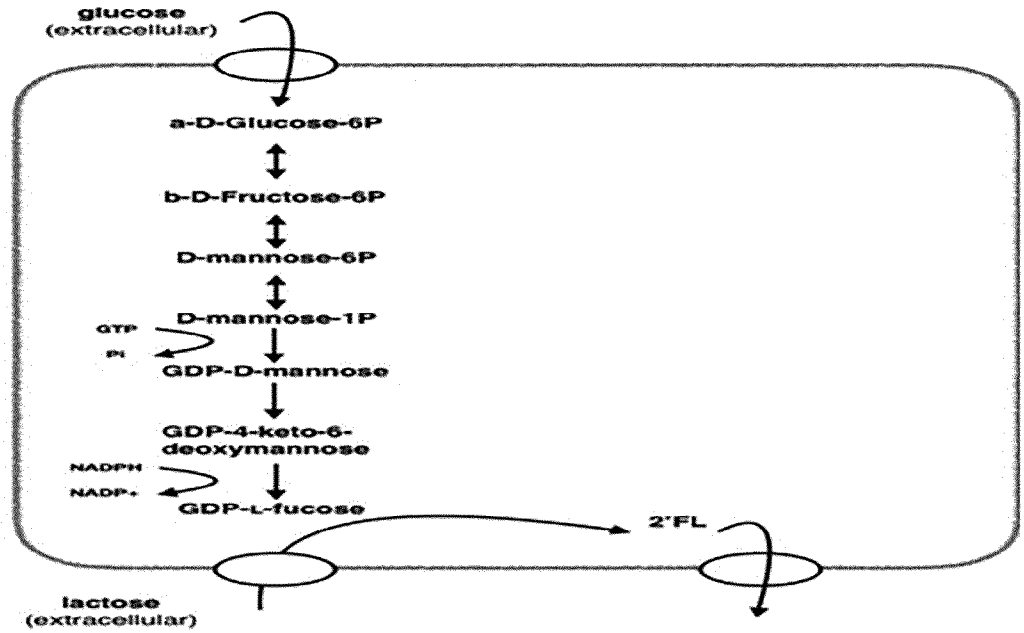
[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 재조합 코리네박테리움 글루타미쿰은,
포스포만노뮤타아제 (Phosphomannomutase)가 과발현되도록 형질전환되고, GTP-만노오스-1-포스페이트 구아닐트랜스퍼라아제 (GTP-mannose-1-phosphate guanylyltransferase)가 과발현되도록 형질전환된 것을 특징으로 하는 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 배지는,
글루코오스를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법.

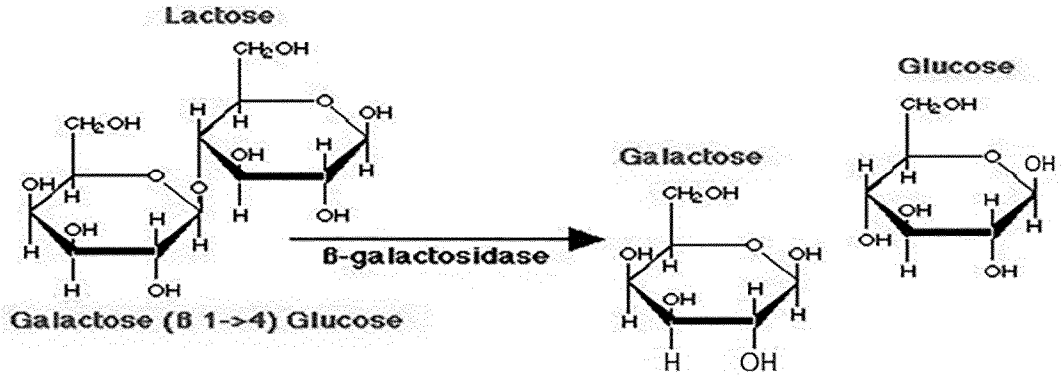
[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법은,
포도당 또는 락토오스를 배양 중에 추가로 공급하는 유가식 배양으로 수행하는 것을 특징으로 하는 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase)는,
배양 정지기 (stationary phase)에서 사멸기 (death phase)로 전환되는 시점에 배지에 투입하는 것을 특징으로 하는 2'-푸코실락토오스 (2'-fucosyllactose)의 생산방법.

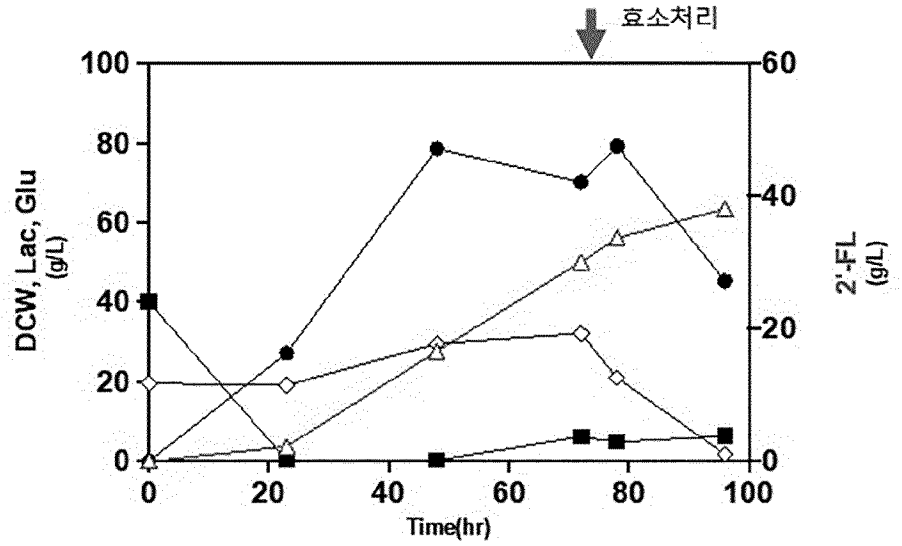
[도1]


glucose
(extracellular)
a-D-Glucose-6P
b-D-Fructose-6P
D-mannose-6P
D-mannose-1P
GTP
PPi
GDP-D-mannose
GDP-4-keto-6-deoxymannose
NADPH
NADP+
GDP-L-fucose
2'FL
lactose
(extracellular)

[도2]


Lactose
Galactose (ß 1->4) Glucose
ß-galactosidase
Galactose
Glucose

[도3]



Time(hr)	DCW	2'-FL	Lactose	Glucose	Etc.
0	0.00	0.00	19.70	40.10	
23	27.18	2.30	19.10	0.30	
48	78.72	16.60	29.60	0.30	
72	70.32	30.10	32.20	6.20	Lactase투입
78	79.32	33.70	21.00	4.90	
96	45.36	38.10	1.80	6.40	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/016912

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/12(2006.01)i; **C12N 15/77**(2006.01)i; **C12N 9/90**(2006.01)i; **C12N 9/12**(2006.01)i; **C12N 9/10**(2006.01)i; **C12N 9/88**(2006.01)i; **C12N 9/04**(2006.01)i; **C12N 9/24**(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)

C12P 19/12(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/54(2006.01); C12N 15/63(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 15/77(2006.01); C12N 9/10(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: 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum), 락토오스(lactose), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 정지기(stationary phase), 사멸기(death phase), 2'-푸코실락토오스(2'-fucosyllactose)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1731263 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 02 May 2017 (2017-05-02) See paragraph [0026]; examples 1-3; and claims 1-7.	1-5
A	KR 10-1544184 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 21 August 2015 (2015-08-21) See entire document.	1-5
A	KR 10-2021-0028292 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 12 March 2021 (2021-03-12) See entire document.	1-5
A	KR 10-1648352 B1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 16 August 2016 (2016-08-16) See entire document.	1-5

☑ 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	Date of mailing of the international search report
02 February 2023	**03 February 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/016912

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2002-0062361 A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 25 July 2002 (2002-07-25) See entire document.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/016912

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/016912

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-1731263	B1	02 May 2017	AU	2017-256470	A1	08 November 2018
				AU	2017-256470	B2	28 January 2021
				CA	3020682	A1	02 November 2017
				CA	3020682	C	10 August 2021
				CN	107849577	A	27 March 2018
				CN	107849577	B	26 November 2021
				EP	3450562	A1	06 March 2019
				JP	2018-515118	A	14 June 2018
				JP	2020-022506	A	13 February 2020
				JP	6650950	B2	19 February 2020
				US	10570399	B2	25 February 2020
				US	10876122	B2	29 December 2020
				US	2018-0298389	A1	18 October 2018
				US	2020-0048640	A1	13 February 2020
				WO	2017-188684	A1	02 November 2017
KR	10-1544184	B1	21 August 2015	WO	2016-153300	A1	29 September 2016
KR	10-2021-0028292	A	12 March 2021	KR	10-2268092	B1	25 June 2021
KR	10-1648352	B1	16 August 2016	None			
KR	10-2002-0062361	A	25 July 2002	AU	2221601	A	03 July 2001
				CA	2395076	A1	28 June 2001
				CN	1433467	A	30 July 2003
				EP	1243647	A1	25 September 2002
				JP	2001-546898	A	10 June 2003
				WO	01-46400	A1	28 June 2001

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/016912

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 19/12(2006.01)i; **C12N 15/77**(2006.01)i; **C12N 9/90**(2006.01)i; **C12N 9/12**(2006.01)i; **C12N 9/10**(2006.01)i; **C12N 9/88**(2006.01)i; **C12N 9/04**(2006.01)i; **C12N 9/24**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12P 19/12(2006.01); C12N 15/52(2006.01); C12N 15/54(2006.01); C12N 15/63(2006.01); C12N 15/70(2006.01); C12N 15/77(2006.01); C12N 9/10(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: 코리네박테리움 글루타미쿰(Corynebacterium glutamicum), 락토오스(lactose), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 정지기(stationary phase), 사멸기(death phase), 2'-푸코실락토오스(2'-fucosyllactose)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1731263 B1 (서울대학교 산학협력단) 2017.05.02 단락 [0026]; 실시예 1-3; 청구항 1-7	1-5
A	KR 10-1544184 B1 (서울대학교산학협력단) 2015.08.21 전체 문헌	1-5
A	KR 10-2021-0028292 A (서울대학교산학협력단) 2021.03.12 전체 문헌	1-5
A	KR 10-1648352 B1 (서울대학교산학협력단) 2016.08.16 전체 문헌	1-5
A	KR 10-2002-0062361 A (교와 핫꼬 고교 가부시끼가이샤) 2002.07.25 전체 문헌	1-5

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2023년02월02일(02.02.2023)	**2023년02월03일(03.02.2023)**

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**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/016912

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/016912

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1731263 B1	2017/05/02	AU 2017-256470 A1	2018/11/08
		AU 2017-256470 B2	2021/01/28
		CA 3020682 A1	2017/11/02
		CA 3020682 C	2021/08/10
		CN 107849577 A	2018/03/27
		CN 107849577 B	2021/11/26
		EP 3450562 A1	2019/03/06
		JP 2018-515118 A	2018/06/14
		JP 2020-022506 A	2020/02/13
		JP 6650950 B2	2020/02/19
		US 10570399 B2	2020/02/25
		US 10876122 B2	2020/12/29
		US 2018-0298389 A1	2018/10/18
		US 2020-0048640 A1	2020/02/13
		WO 2017-188684 A1	2017/11/02
KR 10-1544184 B1	2015/08/21	WO 2016-153300 A1	2016/09/29
KR 10-2021-0028292 A	2021/03/12	KR 10-2268092 B1	2021/06/25
KR 10-1648352 B1	2016/08/16	없음	
KR 10-2002-0062361 A	2002/07/25	AU 2221601 A	2001/07/03
		CA 2395076 A1	2001/06/28
		CN 1433467 A	2003/07/30
		EP 1243647 A1	2002/09/25
		JP 2001-546898 A	2003/06/10
		WO 01-46400 A1	2001/06/28