(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 3 월 12 일 (12.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/050659 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/81 (2006.01) *C07K 14/195* (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) *C12P 7/18* (2006.01)
C12N 9/38 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/011505

(22) 국제출원일: 2019 년 9 월 5 일 (05.09.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0106567 2018 년 9 월 6 일 (06.09.2018) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김경헌 (**KIM, Kyoung Heon**); 06601 서울시 서초구 서초중앙로 200, 18동, 805호 (서초4동, 삼풍아파트), Seoul (KR). 진용수 (**JIN, Yong Su**); 61822 일리노이주 샴페인 샌드힐 레인 3005, Illinois (US). 김동현 (**KIM, Dong Hyun**); 49374 부산시 사하구 감천로 105번길 40 (감천동 감천아파트) 2동 305, Busan (KR). 윤은주 (**YUN, Eun-Ju**); 08640 서울시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥동, 현대빌라), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (**DANA PATENT LAW FIRM**); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 4~6층, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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:

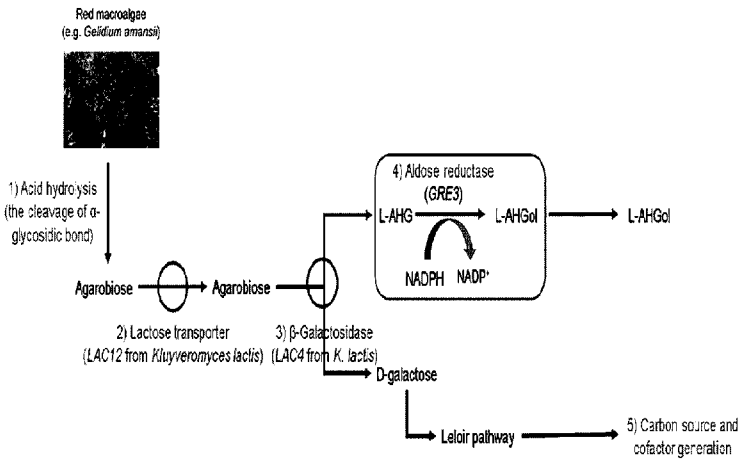
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** NOVEL METHOD FOR BIOLOGICALLY PRODUCING SUGAR ALCOHOL FROM AGAR

(54) **발명의 명칭:** 한천으로부터 당 알코올의 생물학적 신규 제조방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for biologically producing, from seaweeds, 3,6-anhydro-L-galactitol (L-AHGol) which is a novel sugar alcohol, and agarobititol (ABol) which is in a disaccharide form having 3,6-anhydro-L-galactitol (L-AHGol) as a reducing end, by using a genetic engineering technique in GRAS strains.

(57) **요약서:** 본 발명은 해조류로부터 신규한 당 알코올인 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 및 이것을 환원성 말단으로 가지는 이당류 형태인 아가로바이티톨(agarobititol; ABol)을 GRAS 균주를 유전자조작 기술을 이용하여 생물학적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

WO 2020/050659 A1

명세서

발명의 명칭: 한천으로부터 당 알코올의 생물학적 신규 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 해조류로부터 신규한 당 알코올인 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 및 이것을 환원성 말단으로 가지는 이당류 형태인 아가로바이티톨(agarobititol; ABol)을 GRAS 균주 를 이용하여 생물학적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 해양은 지구의 약 71%을 차지하고 있으며, 저온, 고압, 저광, 저산소 및 고염의 환경과 같이 육상 환경과 매우 다르다. 이러한 환경에서 서식하는 해양생물은 매우 다양하며 그들의 특징 또한 육상생물과 다른 고유한 특징을 지니고 있다. 그 중 해조류는 육상식물과 달리 독특한 구성성분으로 이루어져 있다. 특히 육상식물에는 없는 탄수화물들로 인해 수분을 잘 흡수하고 보존하는 등 매우 독특한 특성을 지니고 있다.

[3] 해조류 중 특히 홍조류인 한천은 수분을 보유하여 겔을 형성함으로써 식품 및 의약 산업에 널리 이용되고 있다. 이런 한천을 구성하는 주요한 다당체인 아가로스는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)와 D-갈락토오스(D-Gal)가 알파-1,3-결합과 베타-1,4-결합이 교차적으로 번갈아가며 연결되어 있는 중합체이다. 이 중 L-AHG는 육상생물에 존재하지 않는 희귀한 당으로서 미백 및 보습 효과가 뛰어나 화장품 소재로 사용될 수 있으며, 항염증, 항충치 및 대장암 예방 효과를 가진 복합 기능성 고부가가치 소재이다. 이런 L-AHG의 기능성 때문에 고부가가치 소재로 사용하기 위해 홍조류로부터 L-AHG를 생산하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 뿐만 아니라, L-AHG를 환원말단에 지니고 있는 이당류인 아가로바이오스(agarobiose; AB) 역시 뛰어난 항염증 효과를 지니고 있다고 알려져 있다.

[4] 그러나 이런 복합기능성을 지니고 있는 고부가가치 소재임에도 불구하고 L-AHG 및 AB는 산업적으로 이용하기가 어렵다. 그 이유는 L-AHG 및 AB가 고온 및 산 조건에서 매우 불안정하여 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF) 등으로 쉽게 전환되어 그 기능성을 상실하는 큰 문제점이 있기 때문이다.

[5] 따라서 L-AHG 뿐만 아니라, AB의 열안정성에 대한 문제점을 해결하기 위해 이 당들에 상응하는 신규한 당알코올로 전환하고자 한다. 당알코올은 당의 알데하이드기 또는 케톤기에 수소가 첨가되면서 알코올기로 치환된 당류의 총칭이다. 이런 당알코올은 천연당에는 없는 다양한 기능을 지니고 있으며, 천연당보다 감미도가 낮고 청량감을 나타낸다. 이런 이유로 솔비톨, 자일리톨, 만니톨 등의 많은 당알코올들이 식품첨가물로 사용되고 있으며, 말티톨, 락티톨, 에리스리톨 등은 그 자체로 식품으로 취급되고 있다. 또한, 당알코올은 화학 및

생물학적 촉매반응을 통해서 유용한 화학물질로 전환될 수 있다. 이렇듯 당알코올은 잠재적인 고부가가치 소재이며, 신규한 당알코올을 생산하는 것은 필요하다.

[6] 홍조류의 아가 또는 아가로스로부터 당 알코올인 아가로바이티톨(agarobititol; ABol) 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)을 진핵세포인 효모에서 생산한 연구는 전혀 보고된 바가 없다.

[7] 본 발명자들은 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*; NRRL: Y-8279) 유래의 효소 유전자들을 효모에 도입하여 아가로바이티톨 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 생산을 위한 최적의 조건을 확립하여, 상기 효모를 배양하여 고농도 및 고수율의 당 알코올을 최초로 생산함으로써 본 발명을 완성하였다.

[8] [선행기술문헌]

[9] 한국공개특허 제10-2017-0114785호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명의 목적은 당 알코올인 아가로바이티톨(agarobititol; ABol) 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)을 효소 재조합 기술을 이용하여 효모로부터 상기 당 알코올들을 생산하기 위한 것으로, 재조합 효모 및 상기 재조합 효모를 이용한 아가로바이티톨 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)의 대량 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[11] 효모는 다른 박테리아에 비해서 에탄올, 유기산 및 저해제에 대한 내성이 높은 것으로 알려져 있으며 빵과 와인과 같이 식품에서도 널리 이용되는 안전한 미생물로 알려져 있어 바이오연료 및 화학소재를 생산에 널리 이용되고 있다.

[12] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 (3,6-anhydro-L-galactose; L-AHG)는 복합기능성을 지니고 있는 고부가가치 소재임에도 불구하고 온도에 큰 영향을 받아 쉽게 5-HMF로 전환된다. 따라서 이를 해결하고자 L-AHG의 당알코올인 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)을 생산하고자 한다. L-AHGol을 생산하기 위해서는 크게 두 가지가 필요하다. 첫 번째는 홍조류로부터 아가로바이오스 또는 L-AHG를 효율적으로 쉽고 간편하게 생산하여야 하고, 두 번째는 생산된 아가로바이오스 및 L-AHG를 아가로바이티톨(agarobititol; ABol) 및 L-AHGol로 각각 전환해야한다.

[13] 먼저, L-AHG 및 아가로바이오스를 생산하기 위한 연구들은 많이 진행되어 왔다. 대표적으로, 첫 번째는 산을 이용하여 고온에서 아가 또는 아가로스를 가수분해하여 아가로바이오스 및 L-AHG를 생산하는 방법이 있다. 두 번째는 엔도 및 엑소 베타-아가레이즈들을 이용해서 아가 또는 아가로스를

네오아가로바이오스(neoagarobiose; NAB)로 가수분해 한 후, 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소(α-neoagarobiose hydrolase; α-NABH)를 이용하여 L-AHG를 생산하는 방법이 있다. 세 번째는 위의 두 방법을 합친 것으로 아가 또는 아가로스를 화학촉매로 먼저 액화시킨 후 베타-아가레이즈들과 α-NABH를 이용하는 방법이다. 최근에는 인산을 촉매로 하여 고농도의 아가로스를 액화시킬 뿐만 아니라, 선택적으로 알파-1,3-글리코시딕 결합만 가수분해하여 AB까지 한 번에 생산하는 공정이 연구되었다. 이렇게 생산된 AB는 이를 가수분해 할 수 있는 효소 한 가지만 이용해서 단당류인 L-AHG와 D-Gal로 가수분해 될 수 있기 때문에 매우 간단하고 효율적인 공정이 될 수 있다.

[14] 그 다음으로, 생산된 아가로바이오스 및 L-AHG를 그것의 당 알코올 형태인 아가로바이티톨 및 L-AHGol로 전환하기 위해서는 아가로바이오스 및 L-AHG를 환원시켜야 한다. 이러한 방법으로는 크게 화학적 환원제를 사용하는 화학적 방법과 환원효소(reductase)를 이용하는 생물학적 방법이 있다. 오늘날 유전자 조작 기술이 발전함에 따라 대표적인 당 알코올인 자일리톨을 생물학적 방법으로 생산하기 위해 자일로스를 자일리톨로 환원할 수 있는 환원효소를 도입한 효모인 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae)*을 이용하여 생산하는 연구가 되어 있다.

[15] 따라서 본 발명에서는 홍조류의 아가 또는 아가로스로부터 신규한 당 알코올인 아가로바이티톨 및 L-AHGol을 효율적으로 생산하기 위해 인산을 이용하여 아가로스로부터 아가로바이오스를 생산한 다음, 아가로바이오스를 가수분해하는 효소를 이용하여 효율적으로 L-AHG를 생산하는 공정 및 효소를 이용하여 이를 환원시키는 생물학적 환원반응을 이용하여 아가로바이티톨 및 L-AHGol로 전환하는 공정을 대사공학적인 방법을 이용하여 합치고자 하였다.

[16] 따라서, 본 발명은 알도스 리덕테이즈(Aldose Reductase; AR)를 암호화하는 유전자 및 락토오스 퍼메이즈(Lactose Permease)를 암호화하는 유전자를 포함하는, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올 생산하는 재조합 효모를 제공한다.

[17] 상기 재조합 효모는 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)를 암호화하는 유전자를 더 포함할 수 있다.

[18] 상기 알도스 리덕테이즈(aldose reductase)를 암호화하는 유전자, 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease)를 암호화하는 유전자 및 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)를 암호화하는 유전자 중 하나 이상은 다른 효모 종에서 유래된 외래 유전자이거나, 상기 재조합 효모의 내재 유전자일 수 있다.

[19] 구체적인 일 실시예에서, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 효모는 아가로바이오스를 흡수하여 기질로 사용하지 못하며, 아가로바이오스를 단당류로 분해하는 효소를 포함하고 있지 않다. 이에 본

발명자들은 상기 효모가 아가로바이오스를 세포 내로 흡수할 수 있도록 락토오스 트랜스포터인 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease)를 암호화하는 *LAC12* 유전자를 도입하였고. 추가로, 아가로바이오스를 L-AHG로 당화시키는 효소인 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)를 암호화하는 *LAC4* 유전자를 도입하였다.

[20] 더 구체적으로, 상기 알도스 리덕테이즈(aldose reductase)를 암호화하는 유전자는 상기 재조합 효모의 내재 유전자이며, 상기 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease)를 암호화하는 유전자 및/또는 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)를 암호화하는 유전자는 외래 유전자일 수 있다.

[21] 보다 더 구체적으로, 본 발명의 재조합 효모는 상기 알도스 리덕테이즈(aldose reductase)를 암호화하는 유전자로 서열번호 1로 표시되는 *GRE3* 유전자가 내재된 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)이고, 상기 효모에 락토오스 트랜스포터인 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease)를 암호화하는 서열번호 2로 표시되는 *LAC12* 유전자 및/또는 아가로바이오스를 L-AHG로 가수분해(당화)시키는 효소인 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)를 암호화하는 서열번호 3으로 표시되는 *LAC4* 유전자가 외래유전자로 상기 효모에 형질전환되었다. 상기 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease) 및 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)를 암호화하는 상기 유전자는 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*; NRRL: Y-8279)에서 유래되었다.

[22] 따라서, 상기 효소들을 포함하는 당 알코올 생산용 재조합 효모는 홍조류의 아가 또는 아가로스로부터 제조된 아가로바이오스를 기질로 사용하여 상기 아가로바이오스를 이것의 환원형태인 아가로바이티톨로 전환시킬 수 있고, 상기 아가로바이오스를 단당류인 L-AHG로 분해 한 후, L-AHG의 환원형태인 L-AHGol로 전환시킬 수 있다.

[23] 구체적으로, 상기 재조합 효모로 흡수된 아가로바이오스를 출발물질로하여 세포 내에서 아가로바이오스는 두 단계의 효소반응에 의해서 당 알코올이 생성이 되며 그 반응은 도 1과 같다. 더 구체적으로, 기질인 아가로바이오스는 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)에 의하여 단당류인 L-AHG 및 D-galactose로 가수분해되고, 상기 L-AHG는 알도스 리덕테이즈(aldose reductase)에 의해 당 알코올인 L-AHGol로 전환될 수 있다. 또한, 상기 알도스 리덕테이즈(aldose reductase)는 최초 기질인 아가로바이오스를 당 알코올인 ABol로 전환시킬 수도 있다. 따라서, 상기 재조합 효모에 의해 생성되는 당 알코올은 L-AHGol 및 ABol 일 수 있다.

[24] 상기 알도스 리덕테이즈(aldose reductase)는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시될 수 있고, 상기 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease) 및 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)는 각각 서열번호 5 및 6의 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[25] 상술한 유전자들은 효소의 물리 화학적 활성을 갖고 하나 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예컨대, 서열번호 1 내지 3에 기재된 어느 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 효소의 물리 화학적 특성을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드도 포함한다. '엄격한 조건하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드' 라 함은, 예컨대 설명서에 기술된 조건하(0.5×SSC를 포함하는 일차 세척 완충액으로 42℃에서 세척)에서 ECL 직접 핵산 표지화 및 검출 시스템(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여, 효소 단백질로부터 임의적으로 선택된 적어도 20, 바람직하게는 적어도 30의 연속적 잔기(예를 들어, 40, 60 또는 100 연속 잔기)의 서열을 포함하는 하나 이상의 프로브 DNAs에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 분리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. '분리된 폴리뉴클레오티드'라 함은 천연적으로 발생하는 폴리뉴클레오티드에 비해 상이한 형태로 존재하는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 예를 들어, 다른 생물체의 게놈에 통합된 벡터 및 폴리뉴클레오티드는 상기 분리된 폴리뉴클레오티드에 포함된다. 또한, 상기 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, PCR 산물, 또는 제한 단편으로서 얻어진 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또한, 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 부분으로서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 '분리된 폴리뉴클레오티드'에 또한 포함된다.

[26] 상술한 본 발명의 효소들을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 하기 방법에 의해 분리할 수 있다: 서열번호 1 내지 3의 폴리뉴클레오티드 서열에 기초한 각각의 PCR 프라이머를 설계하고, 주형(template)으로서 효소-생산 균주 유래의 염색체 DNA나 cDNA 라이브러리를 이용한 PCR을 수행하여 본 발명의 DNA를 얻는다.

[27] 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 프로브로서 얻어진 DNA 단편을 이용하여, 콜로니 혼성화, 플라크 혼성화 등으로, (a) 효소-생산 균주에서 유래된 염색체 DNA의 제한효소 단편을 파지나 플라스미드에 도입하고 상기 파지나 벡터로 대장균 세포를 형질전환하여 얻어진 라이브러리, 또는 (b) cDNA 라이브러리에 대한 스크리닝을 수행함으로써 제조할 수 있다.

[28] 택일적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 PCR로 얻어진 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 분석; 알려진 DNA 서열의 외부에 가닥(strand)을 신장하기 위해 분석된 서열에 기초한 PCR 프라이머의 설계; 및 적절한 제한효소로 효소-생산 균주의 염색체 DNA의 소화 및 주형으로서 상기 DNA를 이용하는 자가환화 반응(self-cyclizing reaction)에 의한 역-PCR을 수행함으로써 얻어질 수 있다(*Genetics*, 120, 621-623 (1988)). 또한, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RACE 방법으로 얻어질 수 있다(Rapid Amplification of cDNA End, 'PCR Jikken Manual (Manual for PCR experiments)', 25-33, HBJ Publishing Bureau).

[29] 상기 방법으로 클로닝된 게놈 DNA 및 cDNA에 더하여, 본 발명의

폴리뉴클레오티드는 합성된 DNAs를 포함한다.

[30] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[31] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

[32] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터에 상술한 효소 암호화 핵산을 각각 또는 함께 삽입함으로써 제조될 수 있다. 상기 대장균 균주 발현용 벡터는 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균주 발현용 벡터가 제한 없이 사용될 수 있다.

[33] 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 방법은 외래 유전자를 효모로 형질전환하고 상기 유전자들의 보다 안정한 발현을 위하여 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하였다. 상기 효소들를 암호화하는 유전자를 포함하는 도너 플라스미드 및 특정한 위치를 절단하여 상기 유전자를 도입하기 위한 가이드 플라스미드를 제조하여 CRISPR/Cas9와 함께 숙주 세포에 도입하여 재조합 효모를 제조하였다.

[34] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화칼슘($CaCl_2$) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[35] 상기 재조합 효모는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 쉬조사카로마세스(*Schizosa ccharomyces*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*), 피치아 안거스타(*Pichia angusta*), 캔디다 보이디니이(*Candida boidinii*) 및 블라스토보트리스 아데니니포란스(*Blastobotrys adeninivorans*) 중 하나 이상일 수 있고, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 일실시예에서, 상기 재조합 효모는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하였다.

[36] 본 발명은 또한 기질 및 탄소원을 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모를 발효시키는 단계를 포함하는 당 알코올 생산 방법을 제공한다.

[37] 일반적으로, 형질전환된 세포(효모를 포함)들은 형질전환되기 이전에는 이용하지 않았던 기질을 흡수할 수 없거나, 상기 기질로부터 새롭게 생성된 산물에 대하여 내성이 없어 상기 기질이나 생성물이 형질전환된 세포의 대사를 방해하거나 독성으로 작용할 수 있고, 이것은 원하는 생성물의 생산을 저해하는 하나의 원인이 된다. 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 재조합 효모의 당 알코올 생산 효율 및 기질의 세포독성 여부를 확인한 결과, 기질인 아가로바이오스가 형질전환 균주의 대사를 방해하여 성장을 저해하는 것으로 확인하였고, 이에 본 발명자들은 당 알코올의 대량생산을 위한 새로운 방안을 찾았다.

[38] 이에 따라, 본 발명은

[39] 상기 재조합 효모를 고농도 세포 배양하는 단계;

[40] 상기 기질인 아가로바이오스를 고농도로 생산하는 단계; 및

[41] 상기 고농도로 배양된 재조합 효모를 상기 생산된 고농도의 아가로바이오스 및 탄소원으로 D-Gal D-Glc 및 락토오스 중 하나 이상을 사용하여 유가식 배양하여 발효시키는 단계를 포함하는, 당 알코올 대량 생산 방법을 제공한다.

[42] 구체적인 일 실시예에서, 기질인 아가로바이오스의 농도가 높아짐에 따라, 재조합 효모가 탄소원의 흡수가 저하되어 세포성장이 저해되기 때문에, 최종산물인 당 알코올의 대량 생산을 위하여 고농도의 아가로바이오스 및 고농도로 세포 배양한 재조합 효모를 이용하여 반응시킴으로써 상기 성장 저해 문제를 해결할 수 있다.

[43] 상기 고농도로 세포 배양한 재조합 효모의 구체적인 농도 범위는 4 g/L 내지 90 g/L일 수 있고, 더 구체적으로, 5 g/L 내지 40 g/L 일 수 있다. 상기 기질인 아가로바이오스의 농도는 100 g/L 내지 300 g/L 일 수 있고, 더 구체적으로 100 g/L 내지 150 g/L 일 수 있다.

[44] 아울러, 상기 재조합 효모의 성장률을 높이기 위해 유가식 배양(fed-batch fermentation)을 통해 탄소원 또는 기질을 배지 중에 지속적으로 공급하되, 탄소원 또는 기질의 공급량 및 세포의 이용량을 동등하게 하여 기질 또는 탄소원의 흡수를 서로 저해하는 상황을 제거하였다. 또한, 부산물에 해당하는 갈락티톨(Galactitol;Galol)의 생산을 최소화하기 위해 탄소원으로 D-Gal을 이용할 수 있다.

[45] 보다 구체적으로, 상기 재조합 효모의 유가식 배양은 먼저 탄소원인 D-Gal을 사용하여 3 내지 7회에 걸쳐 수행하여 세포의 충분한 성장을 유도하고, 그 다음 기질인 아가로바이오스로 3 내지 7회에 걸쳐 유가식 배양을 수행하여 목적하는 당 알코올을 높은 수율로 얻을 수 있다.

[46] 본 발명의 상기 방법에 기술된 재조합 효모 및 효소 반응에 대한 부분은 전술한 바와 동일하므로, 중복기재를 방지하기 위하여 생략한다.

발명의 효과

[47] 본 발명은 당 알코올을 생합성할 수 있는 재조합 효모를 제조하고, 이를 고농도 세포 배양 및 유가식 배양을 조합함으로써 아가로바이티톨 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol)의 대량 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[48] 도 1는 *S. cerevisiae*를 이용하여 홍조류로부터 생물학적인 방법으로 L-AHGol을 생성하기 위한 전체적인 모식도이다.

[49] 도 2는 *S. cerevisiae* 유래 *GRE3* 유전자를 pET21α+ 벡터에 클로닝하여 대장균(*Escherichia coli*)을 이용하여 과발현 시킨 후 정제한 SDS-PAGE 결과이다.

[50] 도 3는 *S. cerevisiae* 유래 *GRE3*에 의해 과발현된 AR에 대해 L-AHG 및 AB 반응성 결과이다. (A)는 L-AHG 및 AB가 AR에 반응하여 L-AHGol 및 ABol로 전환되는 구조적 변화 및 분자량을 나타낸 것이다. (B)는 L-AHG 및 AB에 AR를 반응시켰을 때 반응성을 보조인자인 NADPH가 감소하는 경향을 spectrophotometer를 이용하여 340 nm에서 측정한 결과이다. 이때, 자일로스와 갈락토오스를 양성 대조군으로 두었다. (C)는 L-AHG에 대한 AR의 반응 전 후 산물을 GC/MS를 이용하여 측정한 TIC 결과이다. (D)는 L-AHG에 대한 AR 반응 전 산물에서 L-AHG의 고유 mass spectrum이다. (E)는 L-AHG에 대한 AR 반응 후 산물에서 생성된 L-AHGol의 고유 mass spectrum이다. (F)는 L-AHG에 대한 AR 반응 후 산물에서 생성된 L-AHGol를 LC/MS-IT-TOF 분석한 mass spectrum이다. (G)는 AB에 대한 AR의 반응 전 후 산물을 GC/MS를 이용하여 측정한 TIC 결과이다. (H)는 AB에 대한 AR 반응 전 산물에서 AB의 고유 mass spectrum이다. (I)는 AB에 대한 AR 반응 후 산물에서 생성된 ABol의 고유 mass spectrum이다. (J)는 AB에 대한 AR 반응 후 산물에서 생성된 ABol를 LC/MS-IT-TOF 분석한 결과로 ABol의 tandem mass spectrum이고, 그것의 삽입 그림은 ABol의 mass spectrum 결과이다.

[51] 도 4는 *K. lactis* 유래 락토오스 운반체(lactose transporter)를 발현시킬 수 있는 유전자 *LAC12*를 도입시킨 유전자 조작된 D452-2-L12와 parent 균주인 D452-2에 대해 AB를 세포안으로 들어오는 효과를 최소배지에서 확인한 실험 결과이다. (A)는 탄소원 없이 D452-2-L12로 AB를 섭취하는 결과, (B)는 글루코스를 탄소원으로 주었을 때 D452-2-L12로 AB를 섭취하는 결과, (C)는 갈락토오스를 탄소원으로 주었을 때 D452-2-L12로 AB를 섭취하는 결과이다. (D)는 탄소원 없이 parent 균주인 D452-2로 AB를 섭취하는 결과, (E)는 글루코스를 탄소원으로 주었을 때 parent 균주인 D452-2로 AB를 섭취하는 결과, (F)는 갈락토오스를 탄소원으로 주었을 때 parent 균주인 D452-2로 AB를 섭취하는 결과이다.

[52] 도 5는 *K. lactis* 유래 베타-갈락토오시데이즈를 발현시킬 수 있는 유전자인 *LAC4*를 도입시킨 유전자 조작된 D452-2-L124와 *LAC4*가 도입되지 않은 균주들 간의 AB 가수분해 효과를 알아보기 위해 조효소 실험 결과이다. 실험 균주로는

D452-2-L124, D452-2-L12 및 parent D452-2으로 비교하였으며, 삽입 그림의 양성 대조군으로 락토오스에 대한 다음 균주들의 조효소 실험 결과이다.

[53] 도 6는 AB에 대한 D452-2, D452-2-L12 및 D452-2-L124의 세포 성장 저해 및 탄소원인 글루코스 섭취 저해 효과를 최소배지에서 실험한 결과이다. (A)는 AB 농도에 따라 다음 균주들의 비성장율을 나타낸 결과, (B)는 AB 농도에 따라 다음 균주들의 글루코스 섭취율을 나타낸 결과이다.

[54] 도 7는 최소배지에서 AB 농도에 따라 고농도의 D452-2-L124 균주의 L-AHGol 생산을 위한 발효 경향이다. (A)는 10 g/L AB, (B)는 20 g/L AB, (C) 45 g/L AB 및 (D) 90 g/L AB를 기질로 하였을 때 D452-2-L124 균주의 발효 경향이다.

[55] 도 8는 20%(w/w) 아가로스를 인산 가수분해하여 AB를 생산하는 HPLC 결과이다.

[56] 도 9는 최소배지를 이용한 발효기에서 AB 유가식 배양(fed-batch)를 이용한 D452-2-L124의 L-AHGol 생산 발효 경향이다.

[57] 도 10는 도 9에서 발효기를 이용하여 생산된 L-AHGol을 G-10 레진을 이용한 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatograph) 분리 및 정제한 결과이다.

[58] 도 11는 L-AHG 및 AB와 이에 상응하는 당알코올인 L-AHGol 및 ABol의 열안정성을 실험한 결과이다. (A)는 L-AHG, (B)는 AB, (C)는 L-AHGol 및 (D)는 ABol에 대한 열안정성 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[59] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[60]

[61] **<실시예 1>** *S. cerevisiae* 유래 AR을 발현시키는 *GRE3* 유전자를 *E. coli*(DE3)에 클로닝, 과발현 및 정제

[62] *S. cerevisiae* D452-2의 게놈 DNA를 얻기 위해 D452-2를 20 g/L 글루코스가 들어 있는 YP 배지에서 30°C, 24시간 동안 배양하였다. 게놈 DNA는 상용화 DNA 분리 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 게놈 DNA로부터 표적 유전인 *GRE3*를 PCR에 의해 증폭시켰다. 사용된 프라이머는 5'-CATATGTCTTCACTGGTTACTCTTAATAACGGT-3'(정방향) 및 5'-GCGGCCGCGGCAAAAGTGGGGAATTTACCATCCAA-3'(역방향)이다. 친화도 크로마토그래피를 이용하여 단백질을 쉽게 정제하기 위해 C-말단에 6개의 히스티딘을 고딩하고 있는 유전자의 염기서열을 추가하였다. PCR 산물과 pET21α 벡터는 *NdeI* 및 *NotI*로 각각 절단하고, 라이게이션하여 pET21α_AR 플라스미드를 구축하였다. 이 플라스미드를 대장균 Top10에 형질전환 시켰다.

[63] 이렇게 확보한 유전자를 과발현하기 위해 단백질 발현용 숙주인 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하였다. 이 세포를 50 mg/L 엠피실린이 포함되어 있는

Luria-Bertani(LB) 배지를 이용하여 37°C에서 600 nm 흡광도가 0.4~0.6에 도달할 때 까지 배양하였다. 단백질의 발현을 유도하기 위해 0.1 mM IPTG를 첨가하였고 유도 온도는 16°C로 설정하여 16시간 동안 수용성 형태로 단백질을 과발현하였다. 배양이 끝난 후, 원심분리하여 세포를 회수하고, 이를 20 mM Tris-HCl 버퍼 (pH 7.4)를 이용하여 풀고 난 후, 초음파파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 이를 다시 10,000 g로 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 이 재조합 단백질을 HisTrap 컬럼(GE Healthcare, Piscataway, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질은 Amicon Ultra Centrifugal filter(30,000 분자량 컷오프; Millipore, Billerica, MA, USA)로 농축하였으며, bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, San Hose, CA, USA)로 단백질 농도를 측정하였다.

[64] 발현된 AR은 8% SDS-PAGE를 이용하여 37.1 kDa으로 확인되었다(도 2).

[65]

[66] **<실시예 2> L-AHG 및 AB에 대한 AR의 환원반응 측정**

[67] 현재까지 L-AHG를 기질로 하여 그에 상응하는 당알코올인 L-AHGol로 전환하기 위해 효소를 이용하여 생물학적으로 전환되는지 여부를 확인한 연구결과는 없다. 본 연구에서 L-AHG를 L-AHGol로 전환하기 위해 GRAS 균주인 *S. cerevisiae*의 *GRE3* 유전자에 의해 발현되는 내재적 효소인 AR에 대해 검토해보았다. *S. cerevisiae* 유래 AR는 글루코스, 자일로스, 아라비노스 및 글리세르알데하이드와 같은 알데하이드기를 가진 여러 알도스에 광범위하게 반응하여 그에 상응하는 당알코올을 생성한다고 알려져 있다.

[68] AR의 반응성을 확인하고자 기질을 L-AHG 및 AB 뿐만 아니라, 양성 대조군으로 자일로스와 갈락토오스도 기질로 선정하였다. 효소반응 조건은 pH 6.0 sodium phosphate 버퍼상에서 30°C 반응을 시켰다. 보조인자로 1 mM NADPH를 사용하였으며, 각각의 기질은 2 mM에 단백질 농도는 9.36 nmol로 하여 반응하였다. 도 3는 AR의 효소반응 결과이다. 도 3A와 같이 L-AHG 및 AB가 AR에 의해 환원반응으로 L-AHGol 및 ABol로 전환되면 알데하이드기에 수소가 첨가됨으로 인해 구조적 변화가 다음과 같다. 또한 그에 따른 분자량의 변화는 각각 L-AHG 162에서 L-AHGol 164 및 AB 324에서 ABol 326으로 된다. 도 3B에 보듯이, AR은 양성 대조군인 자일로스에 가장 잘 반응하였고 그다음 L-AHG에 반응성을 크게 보였다. 여기서 흥미로운 점은 L-AHG를 환원성 말단으로 지니고 있는 이당류인 AB 역시 AR에 의해 ABol로 전환되는 것으로 나타났다.

[69] 실제로 AR에 의해 L-AHG 및 AB가 L-AHGol 및 ABol로 전환되었는지 확인하기 위해 GC/MS 및 LC/MS-IT-TOF를 이용하여 효소반응 전후 산물들을 측정하였다. 우선 GC/MS 분석을 위해 유도체화 과정은 다음과 같다. L-AHG 및 AB에 대한 AR의 효소반응 전 후 산물들의 20 μl를 스피드 백으로 건조시켰다. 유도체화를 위해 건조된 샘플에 10 μl의 4%(w/v) O-methylhydroxylamine

hydrochloride in pyridine을 넣고 30°C에서 90분간 반응시켰다. 그 후, 45 μl의 N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37°C에서 30분간 반응 시켰다. 이때 분석을 위한 기기 RTX-5Sil MS(30m X 0.25mm i.d., 25 μm film thickness, Resteck) 컬럼을 부착한 Agilent 7890A GC/5975C MSD 시스템을 사용하였다. 컬럼 온도는 먼저 150°C에서 1분간 유지하고 330°C까지 20 °C/min으로 승온 시킨 후 5분간 유지하였다. 1 μl의 샘플을 splitless 방식으로 분석하였다. 도 3C의 TIC(total ion chromatography) 결과, 효소반응 후 산물에서 L-AHG 피크가 효소반응 전 L-AHG 피크에 비해 줄어들면서 효소반응 전 산물에 없던 L-AHGol로 추정되는 피크가 생성되었다. 도 3D 및 도 3E는 각각의 L-AHG 및 L-AHGol의 mass spectrum이다.

[70] AR 효소반응 후 산물에서 생성된 L-AHGol을 확인하기 위해 Liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry (LC/MS-IT-TOF) 분석을 하였다. LC/MS-IT-TOF의 분석 조건은 다음과 같다. 컬럼은 Hypercarb Porous Graphitic Carbon LC Column(100 X 2.1 mm, packed with 3 μm particles)을 사용하였으며, 분석하는 동안 컬럼 온도는 70도로 유지하였다. 이동상은 25 μM lithium chloride와 acetonitrile로, 0.2 mL/min의 유속으로 41분간 분석하는 동안 이동상을 0-80%로 변화를 주었다. 전자분무이온화는 양이온 모드로 하였으며, source-dependent parameter들은 nebulizing gas flow가 1.5 L/min, interface 전압은 4.5 kV, 검출기 전압은 1.65 kV, curved desolvation line (CDL) 및 heat block 온도는 200도로 설정하였다. 질량 분석 범위는 100에서 700 *m/z*로 분석하였다. L-AHG가 환원되어 L-AHGol이 되면 분자량은 164가 된다. 여기에 리튬이온이 첨가되어 실제 측정되는 분자량은 171이 된다(도 3F).

[71] 또한 AB 역시 AR에 의해 ABol로 전환된 것을 GC/MS 분석결과 알 수 있었다. 효소반응 전 AB 피크가 효소반응 후 줄어들고 ABol로 추정되는 새로운 피크가 증가하였다(도 3G). 도 3H와 I는 AB 및 ABol의 각각의 mass spectrum이다. 이 역시 LC/MS-IT-TOF로 분석한 결과, AB가 ABol로 환원되면 분자량이 326이 되고 여기에 리튬이온이 첨가되어 실제로 333의 분자량으로 측정된다. 도 3J와 같이 효소반응 후 생산된 물질이 333의 분자량을 지녔으며, 이것의 ABol의 tandem mass spectrum를 통해 화학적인 구조를 확인한 결과, L-AHGol에 리튬이온이 첨가된 분자량인 171.1330과 갈락토오스에 물 분자가 빠진 것에 리튬이온이 첨가된 분자량인 169.1192가 분석되어 ABol의 환원성 말단에 있는 L-AHG가 AR에 의해 L-AHGol로 전환되어 L-AHGol 및 갈락토오스로 구성되어있다는 것을 확인할 수 있었다.

[72]

[73] **<실시예 3> AB로부터 L-AHGol을 생산할 수 있는 균주 제작**

[74] AB를 소비할 수 있는 D452-2-L124는 다음과 같이 제작되었다. *LAC12*를 pRS423-pGPD 플라스미드에 클로닝하였다. *LAC12* 유전자 부분은 K. lactis(NRRL: Y-8279)의 게놈 DNA로부터 *LAC12*-F 및 *LAC12*-R 프라이머를

이용하여 PCR로 증폭시켰다(표 3). PCR 산물과 pRS423-GPD 플라스미드를 제한효소 *SpeI* 및 *SalI*로 자른 후, pRS423-pGPD-*LAC12*를 구축하기 위해 라이게이션을 시켰다. *LAC4* 유전자 역시 *K. lactis*로부터 구축되었다. *LAC4*는 *LAC4*-F 및 *LAC4*-R 프라이머를 이용해서(표 3) PCR로 증폭되었으며, pRS425-pGPD 플라스미드와 같이 제한효소 *SpeI* 및 *SalI*로 자른 후, pRS425-pGPD-*LAC4*를 구축하기 위해 라이게이션을 시켰다.

[75] 유전자들의 안정한 발현을 위해 CRISPR/Cas9을 이용하여 모 균주인 D452-2의 게놈에 유전자들을 도입시키기 위해 가이드 플라스미드 p42K-CS8 및 p42K-CS6을 표 3과 같이 만들어졌다. p42K-CS8 및 p42K-CS6을 구축하기 위해 가이드 RNA 염기서열이 포함하는 gCS8-U 및 gCS8-D 와 gCS6-U 및 gCS6-D 프라이머 쌍을 이용하여 pRS42K 플라스미드를 역방향 PCR(reverse PCR)하였다(표 3). 가이드 RNA의 20 bp 표적 염기서열은 크로모솜 XVI(CS8) 및 VII(CS6)의 empty locus에 결합한다(표 4 및 표 5). 그러면 원하는 표적 유전자들이 다른 유전자들의 기능에 영향을 주지 않고 homologue recombination에 의해 위의 크로모솜 위치에 도입된다.

[76] *LAC12*를 D452-2 균주의 게놈에 도입하기 위해, CRISPR/Cas9 기반 도입을 위해 donor DNA로써 pRS423-pGPD-*LAC12* 플라스미드를 CS8-IU 및 CS8-ID 프라이머들로 증폭시켰다. CS8-*LAC12*가 도입된 세포들은 CS8-CKU 및 CS8-CKD 프라이머들을 이용하여 PCR을 통해서 확인하였다. 이렇게 제작된 균주가 D452-2-L12이다(표 1). 유사하게, CS6-*LAC4*도 pR425-pGPD-*LAC4* 플라스미드로부터 CS6-IU 및 CS6-ID 프라이머들을 사용하여 증폭된 donor DNA를 D452-2-L12로 도입시켰다. 이는 CS6-CKU 및 CS6-CKD 프라이머들로 확인하였으며, 이렇게 제작된 균주가 D452-2-L124이다(표 1).

[77]

[78] [표1]

균주 정보

Strains	**Description**
D452-2	*MATα leu2 ura3 his3 can1*
D452-L12	D452-2 with CS8-*LAC12* integration
D452-L124	D452-2 with CS8-*LAC12*, CS6-*LAC4* integration

[79] [표2]
사용된 플라스미드 정보

Plasmids	**Description**
p423-pGPD	pSR423-pTDH3-tCYC1
p425-pGPD	pSR425-pTDH3-tCYC1
pRS423-pGPD-LAC12	pRS423-pGPD harboring *LAC12* gene from *K. lactis* Y-8279
pRS425-pGPD-LAC4	pRS425-pGPD harboring *LAC4* gene from *K. lactis* Y-8279
Cas9-NAT	p414-TEF1p-Cas9-CYC1t-NAT1
p42K-gCS8	pRS42K carrying guide RNA for integration at CS8 locus
p42H-gCS6	pRS42H carrying guide RNA for integration at CS6 locus

[80]

[81] [표3]
사용된 프라이머 정보

Primers	**Primer sequences**
LAC12-F	5'-tctagagcggccgcactagtgccaccatggcagatcattcgagcag-3'(서열번호 7)
LAC12-R	5'-tctagagcggccgcgtcgacttaaacagattctgcctctg-3'(서열번호 8)
LAC4-F	5'-tctagagcggccgcactagtgccaccatgtcttgccttattcctgagaat-3'(서열번호 9)
LAC4-R	5'-tctagagcggccgcgtcgacttattcaaaagcgagatcaaactc-3'(서열번호 10)
gCS8-U	TGATTCAATCATTCTTATTGgttttagagctagaaatagcaag(서열번호 11)
gCS8-D	CAATAAGAATGATTGAATCAgatcatttatctttcactgcgga(서열번호 12)
CS8-IU	caaaattacctacggtaattagtgaaaggccaaaatctaatgttacaataAATTAACCCTCACTAAAGGGA(서열번호 13)
CS8-ID	gaccgttcccttgtgttgtaccagtggtagggttcttctcggtagcttctGTAATACGACTCACTATAGGGC(서열번호 14)
CS8-CKU	Agtggaacatagaagggg(서열번호 15)
CS8-CKD	Taagcagcccagtgaac(서열번호 16)
gCS6-U	GATACTTATCATTAAGAAAAgttttagagctagaaatagcaag(서열번호 17)
gCS6-D	TTTTCTTAATGATAAGTATCgatcatttatctttcactgcgga(서열번호 18)
CS6-IU	aacctcgaggagaagtttttttaccccctctccacagatcCAGGAAACAGCTATGACCATG(서열번호 19)
CS6-ID	taattaggtagaccgggtagatttttccgtaaccttggtgtcTGTAAAACGACGGCCAGT(서열번호 20)
CS6-CKU	Gtctgccgaaattctgtg(서열번호 21)
CS6-CKD	Cggtcagaaagggaaatg(서열번호 22)

[82] [표4]

1. CS8 region, Chromosome XVI

...
TAGATCTTATACAAAAGCAACTGCGCGCTGTGGTAAAGCTACGGAAACAATGTCCTATCTGTG
GGAAGGTTTGTTCGAGACCTTCAACACTGAGGACTCATTACTTAATACATACGGGAGACACAC
CTTTCAAATGTACTTGGGAGCATTGCAACAAATCTTTCAATGTCAAGAGTAACATGTTAAGGCA
TTTAAGAACCCATCAAAAGAAAATAGCAAAGAAAAAACATCAGTGAaagcattgtttagaatattttgtt
ttcagtgtgattttgatgtaggtgtgacacttttaccaagtaaaatgagtatagatatgtattagttccatataatatattacatg
tagccaacaatcaatttttactgacttccgatttttgaatagtgagaggatttttgttcgaattataatttctacaagaaatttgttt
gcgaatgcatcagcatttgtaatacggttctatactgccgcacgatacattttattctgtctagttcgtaagacaaaggacctttt
catttagtacaacgttgccgacacggatgtcttgatgaatctctgtaccaggaattcaattacctgactagtatgcagttcacta
tcaaaaaaaaaaaaaaaggttaaattggtataatcatggttaaagaacaaacagcctctttcctctacaaaagtatgttaaatgt
aggtagttcaaattgcggtcacgtatatgccaacgttgttaatatataatgatccattggaacaatgaagtttacagaagctca
aaattaatgcaagaataattacgtcaagggagtcataacaaactaagaaaacaaaggaatttgactaagtttgagcgcaat
gatatatccatgcttgatattctgattcatacatatcgtttctgtcatttcaatggaagtctttatttatcaattaccacaacctttagt
attgtgcttattattggtcaaaaggagttcatgcgctagtgatagtcaacccatgaagtgattagtggaacatagaaggggg
ataaatttcctatcggataacaaagaaaaaccaggattattgttttaccaccacatttcaaacttcccgctgaatttcctactac
cctcatttgaaagaacgctttccactctttaggttggcgttgtatcatctttcttccattcaatgcaccaagacttaattttgttggt
taaactcttattctttgtcagtttaaccaacaaaattacctacggtaattagtgaaaggccaaaatctaatgttacaata
t g a t t c a a t c a t t c t t a t t g
cggagaagctaccgagaagaaccctaccactggtacaacacaagggaacggtctcattgacctcgtgcataaccgggaa
ggtaacacatgaatatgctgtgtttgaatcatctccaatccaaactatagggaatgaaaaatttttttgggtacaatgtcttctca
caatatcgtattcttggtcagcaatgtttccaaggatgacagactctttctaagaaaagatttcaagttcaaaatttacataaca
gtgaactatgcagaaaatttacttctagaccacgcatttaacaataatgtttgcccgcaacaataaagtatttggtcgctttaa
gacgttatcagttattttatgagaaggtgtttaccattcgtgctcccatactaaaaccaaggggtaaatagggacccacatttcg
tttctgacagccaacaacgtgccactagcaggacagttattgcaagcgtttatattatgtaattattgttagctgataaatgattta
c a g a a a g c g c t g a t g t t c a c t g g g c t g c t t a
ttcagcaatccccacgcatatttacttcaaagagaaagaatttttgatgtaagtttattgaacgtggaacttggcgtgggg
catttatggctgctatcacacaaatcgcggagcagagtaccccctggattatataacacaactcactaaaatcgctcaaaattg
gggggtacgggttagcgcggcagctcatcgagggaacagcacctagtgcacgtttaattgatagtatcttcagaacgaaa
tcaaatttttcgcagtatcatttacgtttcaagaaacttaaagtgtttggagaaattaggaacgaaaaaaagctactatagaaa
ttgtagcctgtcttcaactgctgtcctcggcttttgacttgcctaagtatatgccgcaatgggcgataagcgggagtgtcggtc
agatctgtggtaaaaaaaagatagcaataaaaaattatgaatttaaacagtagtcttgaatttaaacaagtgatcttgacttga
atacttccatcaatgagtcgctaaaatgaaaatggctgcacaatctcctccgcatatcttaaaaggcagcaattagccagttg
atcaccctacatttccacagaaacgaaaaagtgtaatagttatttttgcggccaatatcgtaagctctagcggtgccttagctt
atgattgttgcaagaaagtttgccttttgactctcctcaggtgtcagtattaacaaacggcgttgaatgtttaagttattatttt
attcatcaaatcgacttggatactttctcggtgatgtcgctaattggattataccattaaggttgtcaccagtgtaaaaattttgc
atcggtacttgcaactacgtgtgaaggtcaagttactcaacgcaaagaaacgttaacatttttacaaatttagctgcagtact
atgttttaagtaatccaaagggaactatttgttatatcccagaattatttacattcgtttcttagtttcataaacaatgaatacctatt
gaatggatagaaattctgacttgattttacgagttattattgctgacattagtccaaagacatctcagttttgtttcctctacaacc
caatgaggaggctagccagggctgtcgcccaaaaaaatagccaataaagcggcaacttttctgtATGTCTTGCATTTT
TTCCGCTGACTTGGGAGTAGAGTACAGCTGCGCGGAGTCGCGTATTACAAATCTTGTACTTTGC
ATTCTGTGCATACGTGAGGAAAAAGCAGCACCTGTTGTGAAAAAAGATAAATTTCTTTTTTTCA
TTTTTCTATCCTCAAAGGAAAATCTTTTCTGCGAAATTTCTAGCCGCTCTTCAGTTTCCGAAGTA
AAGTCGCTGAGGGCGAAAAACAACTTTATTTGCCCACACGCTGTTATAGGCTTCCAGGGAGCA
AAAGCGCAATTGGGAATAAGGTTTCCTCAATTGAATGGTTTGCTTCGCCTACAGCATTAAccaga
aggtaatttgatctcttgtatgtccgctaacagatcttgtccattaattgtttatttttcttcaggtaggctgagcccactttgtagta
gctccctaccattactttttggccttgtagttattggctttgatttttctttctatgacaatcccgttgagcaaccttgcgaagggct
ctttttgaaaaaaaggcgtgggcaagatctctgtat.....

NNNN: CDS of functional gene

NNNN: CDS of not essential protein, or protein with no function (or unknown function)

NNNN: tRNA

NNNN: δ sequence

nnnn: Non-coding region

nnnn: PAM sequence

nnnn: Target sequence for gRNA

nnnn: Homologous region for integration

nnnn: sequencing primer site

[83] [표5]

CS6 영역, 크로모솜 VII

ataaaaTGAAACGGACAGGAATTGAACCTGCAACCCTTCGATTGCAATCTTATTCCGTGGAATTTCCAAGATTTAATT
GGAGTCGAAAGCTCTACCATTGAGCCACCGCTTCatcttgaaatatcgaagatataacattttacttgtctgccgaaattctgtgtttgcta
taatgtttgaattagaatctcttaaaatagctactcatacttcttcataactaatccattagtgaccatatgaagtaatcggacgccacacatcattgatgttt
cacgatggagaatgataacacactaagtggcattgtgggcaaagtaagttaaaacacctattgctcaaatgatcaacttggtgtttgcacatatacggat
gtaagtcatgacattgaaatcataatatgctttcatgataatcatatgagcatgtttaatattactaataaggctgtattctatacttctcttatatagaataag
aagatctgcatttattcttgattgacactacagttcaacaattaattaccaacagaattaattactacctatcgttcacaagctactacgttatcatacacaat
gtaaaaatatgacacaaaaatggaaaaccgtcatcagatttaatggggctgaaacacaagaattcataatgtgatagaataatgggtgaagtgtata
aagaagaatatataatattactgtgtagaaatatcaatttccctttgtgagttctcataacctcgaggagaagtttttttacccctctccacagatcgatactt
atcattaagaaaatggGACACCAAGGTTACGGAAAAATCTACCCGGTCTACCTAATTACTCTCTTGGCGCACTAGTTTTCCGAAAAAAACAGGTAAATTC
TTCTTTAGATAAAGATAAATATAAAACTTCACAGCCATTCACTCACACAAACTAGTCCCTTAGGGTGCGTATAATGATCTGTACATCTTATTTCTATATATCTTA
CCGTGTATTTTTCTTTTCTCAATTCTTGTTCGCAAATAAAAAGATATTCGTGTTTGTGGAAGAACACTAGTTCCGTTTTGTATTCAACCTGGAAATTTACAATAG
ATCTTCATCATCGTATGTCTACCATGTTAATCTCCCGTTAAACTGTTTCACGTTATCAAGATTATGTCATCTATTCCTGGGCGAACATAATTCCTTACAAAAACA
TTTGTCATTACACAAGTGTAAGGGGTAATGAAAAGTAATTTTGTTACAAGTACGCAAAATTCGTTTATTTCAAGAAACACTAAGGATCGTCATTTCCCTTTCT
GACCGATGTTCCTTCTTTTTGCTATTTTTTCCCGAGTCATCTCATCGTTTTGAGTTTTTCCTAGTCCATTAAATTGTCACCTTACTCTCGGAAAAAAGAAACGAC
AAATGCTCCTAGTGCCGTTTTTCGAAGCTTGAAAAAAAAAATTGCAAATTATTTAATTTTGCTGCTAAGGAGTTGAAGTAGGTGCATTCCGCCTTATTGATC
ACCCTGTTAGATTTGTTGCGATCGTTATAGTGCTAGTTTGTCCATTGTTGTGTCATAAAAGATAGCTTTGGGAGAAAATTCATCAAAACAACATATC
ATCAGCGTTATTACAATTCATTGTCCTTCCCAAGTTTTTTTGACGTATAATATTATCGCTATCTGACTCATTAGTACAC
AAATACAGATATACAACCTCAAAATCAAAAATGCCTAGAAACCCATTGAAAAAGGAATATTGGGCAGATGTAGTT
GACGGATTCAAGCCGGCTACTTCTCCAGCCTTCGAGAATGAAAAAGAATCTACTACATTTGTTACCGAACTAACTT
CCAAAACCGATTCTGCATTTCCATTAAGTAGCAAGGATTCACCTGGCATAAACCAAACCACAAACGATATTACCTC
TTCAGATCGCTTCCGTCGTAATGAAGACACAGAGCAGGAAGACATcaacaacacca

[84]

[85] **<실시예 4>** *LAC12*에 의한 세포내로 AB 섭취 효과

[86] 기질인 AB로부터 L-AHGol를 생산하기 위해서 우선 AB가 단당으로 가수분해되어야 한다. 그러나 L-AHG는 열안정성 뿐만 아니라, 배지에 오래 노출되었을 때도 안정성이 떨어지기 때문에 AB를 세포밖에서 가수분해하여 L-AHG를 생산하고 세포내로 섭취하는 것 보다 AB 자체를 세포내로 들여 온 다음, 가수분해하는 것이 L-AHG의 변성을 예방할 수 있다. 따라서 L-AHG의 변성을 최소화하기 위해 AB를 *S. cerevisiae* 내로 섭취하고자 한다. 그러나 native *S. cerevisiae*는 락토오스를 섭취하지 못한다. AB와 락토오스는 D-갈락토오스에 베타-1,4-글리코시딕 결합으로 환원성 말단이 각각 L-AHG 및 글루코스로 결합된 것으로 구조적으로 매우 유사하다. 따라서 우리가 사용하는 parent 균주인 D452-2는 AB를 섭취하지 못할 것으로 예상한다. 이를 해결하기 위해 락토오스를 잘 대사할 수 있는 것으로 알려진 GRAS 효모인 *Kluyveromyces lactis* 로부터 락토오스 운반체를 발현하는 *LAC12*를 가져와서 D452-2에 도입하였다.

[87] 이렇게 구축된 균주인 D452-2-L12와 대조군인 parent D452-2에 대해 *LAC12* 발현에 의해 AB가 세포내로 들어오는지 최소배지(verdyun medium)에서 확인한

결과(도 4), D452-2-L12는 AB를 세포내로 섭취하여 배지 내 AB의 농도가 줄어드는 것을 확인할 수 있었으며, 흥미로운 점은 AB가 ABol로 전환되는 것을 알 수 있다(도 4A). *GRE3*에 의해 발현 되는 AR은 세포내 내재적 효소이기 때문에 이 결과는 AB가 세포내로 섭취되었다는 확실한 증거이다. 그러나 parent D452-2는 배지내 AB의 농도가 줄어들지 않았으며 ABol 역시 검출되지 않았다(도 4D). 혹시 운반체가 섭취할 수 있는 탄소원이 주어졌을 때, AB가 함께 섭취될 수 있는 가능성이나, 그 탄소원으로 에너지를 생성함으로써 AB가 세포내로 섭취될 수 있는 가능성을 확인하고자 대표적인 탄소원인 글루코스 및 갈락토오스를 약 10 g/L 제공한 후 D452-2-L12와 대조군인 parent D452-2에 대해 AB 섭취 실험을 하였다. 이 결과 역시, 두 탄소원인 글루코스(도 4B) 및 갈락토오스(도 4C) 모두 D452-2-L12만 AB를 섭취할 수 있었고, ABol를 생성하였다. 그러나 parent D452-2은 글루코스(도 4E) 및 갈락토오스(도 4F) 모두 섭취하지 못하였다. 따라서 *LAC12*에 의해 D452-2-L12가 AB를 섭취할 수 있게 되었다.

[88]

[89] **<실시예 5>** *LAC4*에 AB 가수분해 효과

[90] L-AHGol 생산을 위한 기질로서 AB가 세포내에 섭취가 되면 세포내에서 L-AHG와 D-Gal로 가수분해 되어야 한다. 앞서 native *S. cerevisiae*는 락토오스를 세포내로 섭취하지 못할 뿐만 아니라, 가수분해 역시 못한다. 따라서 이 역시 락토오스와 AB의 구조적 유사성을 기반으로 락토오스를 잘 대사할 수 있는 *K. lactis*로 부터 락토오스를 가수분해할 수 있는 베타-갈락토시데이즈를 적용하고자 이를 발현하는 유전자인 *LAC4*를 D452-2-L12에 도입하였다.

[91] 이렇게 구축된 균주인 D452-2-L124와 대조군으로 D452-2-L12 및 parent D452-2에 대하여 *LAC4*의 AB 가수분해 능력을 검토하였다. AB 가수분해 검증 방법은 세포내의 효소 반응을 검증하는 것이므로 각각의 세포들을 키운 후 세포들을 수확한 후 세포를 파쇄한 후 얻은 단밸질 즉, 조효소를 가지고 AB의 가수분해능을 측정하였다. 더 자세히는 각각의 균주들을 20 g/L 글루코스가 포함된 영양 배지인 YP 배지에서 30°C에서 중간 대수증식기(mid-exponential growth phage)에서 3000 g로 10분 원심 분리하여 수확하였다. 수확한 세포들을 20 mM Tris-HCl (pH7.4) 버퍼로 풀어준 다음, 초음파파쇄기를 이용하여 세포들을 각각 파쇄하였다. 이렇게 파쇄된 세포들을 4°C, 10,000 g, 10분의 조건으로 원심분리하였다. 이를 BCA 단백질 농도 정량법으로 조단백질 농도를 측정하였다.

[92] *LAC4*에 의한 AB 가수분해 효소반응조건은 다음과 같다. 기질은 AB 및 양성 대조군으로 락토오스를 같이 실험하였다. Sodium acetate (pH 6.0) 버퍼 상에서 기질 농도를 각각 2 g/L에 조단백질을 0.5 g/L로 하여 30°C에서 반응시켰다. 도 5와 같이 D452-2-L124 균주로부터 얻은 조단백질에서 AB가 가장 잘 가수분해되는 것을 확인하였다. 그러나 *LAC4*가 발현되지 않는 균주들인

D452-2-L12 및 parent D452-2로부터 얻은 조단백질은 거의 AB를 가수분해하지 못하였다. 이 결과는 양성 대조군인 락토오스와 일치한다. 하지만, 락토오스보다 AB가 *LAC4*에 의해 발현되는 베타-갈락토이데이즈에 반응성이 낮은 것으로 나타났다. 이는 AB와 락토오스가 구조적 차이점에 의해 기인한 것을 보인다. 이와 같이, *LAC12*에 의해 세포내로 들어온 AB를 *LAC4*에 의해 가수분해 될 것으로 예상된다.

[93]

[94] **<실시예 6> 기질로서 AB 농도에 따른 세포 성장 저해 효과**

[95] 앞서 언급했듯이, L-AHGol을 생산하기 위해서는 AB가 세포내에 들어와서 가수분해되어 L-AHG가 생성되어야 한다. 그러나 L-AHG는 *Streptococcus mutans*에 대해 항균 효과가 있다고 보고 되어있다. 산업화에 있어서 높은 농도의 기질을 투입하는 것은 원하고자 하는 반응산물의 최종 농도를 높일 수 있을 뿐만 아니라, 그로인해 반응기 축소, 적은 양의 물 사용 등과 같이 공정비용을 줄일 수 있기 때문에 중요하다. 그러나 만약에 기질인 AB에 숙주인 *S. cerevisiae*가 생육에 저해를 받는다면, 높은 농도의 AB 투입을 적용하지 못할 것이다. 따라서 이를 확인하고자 다양한 AB 농도에 따른 유전자 조작된 D452-2-L124 및 대조군으로 D452-2-L12 및 parent D452-2의 생육 저해 효과를 확인하였다.

[96] 이를 확인하기 위한 실험은 다음과 같다. 모든 배양 조건은 각각의 균주들에 대해 최소배지(verdyun media) 상에서 20 g/L의 글루코스를 탄소원을 주고 AB의 농도를 0, 10, 20 및 50 g/L으로 각각 달리 주어 30°C에서 300 rpm으로 배양하였다. 그 결과, AB 농도가 높아짐에 따라 D452-2-L124 의 비성장율이 제일 큰 차이로 감소하였다(도 6A). 또한 D452-2-L12 역시 AB의 농도가 증가함에 따라 비성장율이 감소하였다. 그러나 parent D452-2는 D452-2-L124 및 D452-2-L12와 달리 20 g/L 농도의 AB 까지는 비성장율에 영향을 미치지 않았다. AB 50 g/L의 경우에서는 D452-2-L124 및 D452-2-L12은 자라지 못하였으나, parent D452-2는 더디지만 추후에 자랐다. 이는 AB의 농도가 증가함에 따라 탄소원인 글루코스 섭취율을 저하시켰기 때문인 것으로 나타났다(도 6B). 각각 균주들의 글루코스 섭취율 역시 도 6A의 비성장율과 유사한 경향을 나타냈다.

[97] 기질인 AB의 농도가 증가할수록 유전자 조작 균주인 D452-2-L124의 생육을 저해함으로 적은 농도의 세포(low cell density)를 이용하는 발효하는 것은 적절치 못하다. 따라서 이를 해결하기 위해, 고농도 세포 배양을 고려하였다(high cell density).

[98]

[99] **<실시예 7> L-AHGol 생산을 위해 AB 농도에 따른 고농도 세포 배양**

[100] 기질인 AB에 대해 높은 농도가 높아짐에 따라 D452-2-L124가 성장저해를 받기 때문에 고농도 세포 배양을 통해 극복하고자 하였다. 실험 방법은 다음과 같다. D452-2-L124의 농도를 6 g/L의 고농도로 하였고, 이에 대하여 기질인 AB를 약 10, 20, 45 및 90 g/L가 되도록 넣어주었다. 발효는 최소배지(verdyun media)에서

30°C, 300 rpm으로 진행하였다. 그 결과 (도 7 및 표 4), AB 10 g/L의 조건에서는 36 시간 만에 AB를 다 소모하였고, 4.62 g/L의 L-AHGol을 생산하였다. AB를 소비하는 과정에서 초반에는 AB가 ABol로 전환 되었지만 최종 0.10 g/L로 거의 다 가수분해 되었다(도 7A). AB 20 g/L 조건(도 7B)에서는 49 시간 되었을 때, AB를 거의 다 소모하였으며, L-AHGol을 9.25 g/L를 생산하였다. 그러나 AB 10 g/L 조건과는 달리 발효 초기에 AB가 ABol로 전환되었지만, 발효가 끝났음에도 불구하고 부산물로 ABol이 완전히 분해되지 않고 0.33 g/L 존재하였으며, Gal의 당알코올 형태인 갈락티톨(Galactitol; Galol)이 0.33 g/L 생성되었다. AB 농도를 더욱 높인 45 g/L의 경우 (도 7C), 약 84시간 동안 AB를 소비하면서 L-AHGol을 18.62 g/L 생성하였다. 그러나 부산물인 ABol 및 Galol이 1.41 g/L 및 1.46 g/L로 앞선 조건 보다 많이 생성되었다. AB 90 g/L 조건의 경우(도 7D)는 84시간 동안 AB를 약 43.92 g/L 소비하였으며, 12.91 g/L의 L-AHGol을 생성하였다. 이 역시 부산물인 ABol 및 Galol을 각각 2.24 g/L 및 0.98 g/L로 AB 20 g/L 이하 조건보다 많이 생성되었다. 여기서 흥미로운 점은 AB 농도를 급격히 증가할수록 생성되는 L-AHGol의 수율이 감소하였다(표 6). 특히 AB 90 g/L 조건에서는 L-AHGol 수율이 0.29 g/g AB consumed로 매우 낮았다. 부산물인 ABol 및 Galol의 생성 역시 AB 90 g/L를 제외하고는 AB 농도가 증가할수록 점점 수율이 높아졌다. *S. cerevisiase*는 탄소원을 주었을 때, 전형적으로 생산되는 산물이 에탄올, 글리세롤 및 초산으로 알려져 있으나, 최종적으로 이런 산물들이 생성되지 않았다.

[101] 이 결과를 기반으로 AB 20 g/L일 때 까지 L-AHGol 수율이 높았기 때문에 이를 해결하기 위해 AB를 유가식 당화로 통해서 고농도의 AB를 적용하여 고농도 및 고수율의 L-AHGol을 생산하고자 했다.

[102]

[103] [표6]

AB 농도에 따른 고농도 세포 배양의 L-AHGol, ABol 및 Galol의 농도 및 수율

AB concentration (g/L)	L-AHGol		ABol		Galol	
	Titer (g/L)	Yield (g/g AB consumed)	Titer (g/L)	Yield (g/g AB consumed)	Titer (g/L)	Yield (g/g AB consumed)
10	4.62±0.07	0.47±0.01	0.10±0.02	0.01±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
20	9.25±0.00	0.48±0.00	0.33±0.00	0.02±0.00	0.33±0.04	0.02±0.00
45	18.62±0.05	0.42±0.00	1.41±0.06	0.03±0.00	1.46±0.10	0.03±0.00
90	12.91±0.45	0.29±0.01	2.24±0.14	0.05±0.00	0.98±0.09	0.02±0.00

[104]

[105] **<실시예 8> 고농도 아가로스로부터 인산 가수분해를 통해 고농도의 AB 기질 생산**

[106] 홍조류로부터 L-AHGol을 생산하기 위해 아가로스로부터 기질인 AB를 생산하고자 하였다. 앞서 언급했듯이, 공정에서 고농도 기질 투입은 여러 가지로 중요하다. 고농도의 AB를 생산하기 위한 반응 조건은 다음과 같다. 20%(w/w)의 고농도 아가로스를 2%(w/v) 인산을 이용하여 95°C에서 120분간 반응시켰다. 예를 들어 90 g의 아가로스를 최종 20%(w/w)이 되게 하여 360 mL에 반응시켰다.

[107] 그 결과, 최종 128.99 g/L 고농도의 AB를 생산하였다. 이 아가로스 가수분해물을 기질로 사용하기 위해 중화 및 인산을 제거하기 위해 수산화칼슘($Ca(OH)_2$)를 이용하였다. 이를 추후 L-AHGol 생산하는 기질로 사용하였다(도 8).

[108]

[109] **<실시예 9> 발효기를 이용하여 유가식 배양을 통한 아가로스 가수분해물로부터 L-AHGol 생산**

[110] 홍조류로부터 대규모 스케일로 L-AHGol을 생산할 수 있는 가능성을 검토하기 위해 발효기를 적용하였다. 앞선 결과들을 기반으로 고농도의 아가로스 가수분해물을 기질로하여 고농도 및 고수율의 L-AHGol를 생산하기 위해, 첫 번째 고농도 D452-2-L124 세포 배양(high cell density)을 적용하였며, 두 번째 128.99 g/L의 고농도 AB가 함유되어 있는 아가로스 가수분해물을 5번에 걸쳐 유가식 배양을 적용하였다. 마지막으로 부산물인 Galol을 최소하기 위해 전배양 및 세포를 고농도로 올리기 위한 탄소원으로 D-Gal을 이용하여 균주가 D-Gal에 잘 적응하여 소모를 잘 할 수 있도록 설계하였다. 발효기 운용 조건은 1 L 발효기에 반응 부피를 450 mL로 하였으며, 배지는 최소배지(verdyun)을 사용하여 30°C, pH 6.0으로 설정하였다. pH 조절을 위해 각각의 5 N NaOH 및 HCl을 사용하였다. 교반 속도는 500 rpm, 용존 산소량(aeration rate)는 2 vvm을 각각 설정하였다.

[111] 도 9에서 와 같이, 탄소원으로 D-Gal를 20~30 g/L 농도로 유가식 방식으로 첨가해줌으로써 약 30시간동안 초기 세포 농도가 5.51 g/L에서부터 약 4.33배 높은 23.85 g/L 까지 배양하였다. 이때 D-Gal을 섭취하면서 부산물로 에탄올, 글리세롤 및 초산이 생성되었다. 특히 글리세롤은 7.56 g/L가 생성되었다. 30시간 때부터 아가로스 가수분해물을 5번에 걸쳐 투입하였다. 그 결과, 아가로스 가수분해물에 함유되어 있는 AB가 가수분해되어 L-AHGol를 매우 잘 전환되었다. 최종 41.18 g/L 및 0.48 g/g AB로 고농도 및 고수율의 L-AHGol을 성공적으로 생성하였다. 발효가 진행되면서 초기에 생선된 에탄올, 글리세롤 및 초산은 다시 세포가 섭취함으로써 거의 생성되지 않았으며, ABol 및 Galol 역시 0.68 g/L 및 1.18 g/L로 매우 소량 생성되었다. 이는 추후 L-AHGol을 분리 및 정제할 때 매우 장점이다.

[112]

[113] **<실시예 10> 크기배제 크로마토그래피를 이용한 발효산물로부터 L-AHGol 분리 및 정제**

[114] 앞서 발효한 산물로부터 L-AHGol을 분리 및 정제하기 위해서 크기배제 크로마토그래피를 이용하였다. 레진은 Sephadex G-10(GE Healthcare)를 이용하였으며, 이동상은 증류수를 사용하였다.

[115] 도 10과 같이, 아가로스를 인산 가수분해 시킬 때 다 분해되지 않고 남은 높은 중합도를 가진 올리고당 및 발효 때 사용한 배지 성분들 이외에는 다른 부산물이 거의 생성되지 않았기 때문에 크기배제 크로마토그래피를 통해 쉽게 L-AHGol을 분리할 수 있었다. 또한 증류수를 이동상으로 사용하기 때문에 추후 공정이 필요가 없어 간편하다.

[116]

[117] **<실시예 11> L-AHG, AB, L-AHGol 및 ABol의 열안정성**

[118] 발효를 통해 생산하고 크기배제 크로마토그래피를 통해 분리한 L-AHGol 및 L-ABol이 실제로 열에 안정한지 L-AHG 및 AB와 비교 실험하였다. 실험 방법은 4, 25, 50 및 70°C의 조건에서 각각의 물질들이 시간에 지남에 따라 변성되는 정도를 측정하였다.

[119] 도 11에서 보듯이, L-AHG 및 AB는 50°C 조건부터 시간에 지남에 따라 변성되었지만, L-AHGol 및 ABol을 70°C 조건에서도 변성되지 않고 굉장히 안정하였다.

청구범위

[청구항 1] 알도스 리덕테이즈(aldose reductase; AR)를 암호화하는 유전자 및 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease)를 암호화하는 유전자를 포함하는, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올 생산하는 재조합 효모.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)를 암호화하는 유전자를 더 포함하는, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

[청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 당 알코올은 아가로바이티톨(agarobititol; ABol)인, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

[청구항 4] 제 2항에 있어서, 상기 당 알코올은 아가로바이티톨 및 3,6-안하이드로-L-갈락티톨(3,6-anhydro-L-galactitol; L-AHGol) 중 하나 이상인, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

[청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 알도스 리덕테이즈(aldose reductase)를 암호화하는 유전자는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 유래된 *GRE3* 유전자인, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

[청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease)를 암호화하는 유전자는 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*; NRRL: Y-8279)에서 분리되어 상기 재조합 효모로 형질전환된 *LAC12* 유전자인, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

[청구항 7] 제 2항에 있어서, 상기 상기 락토오스 퍼메이즈(Lactose permease)를 암호화하는 유전자 및 상기 베타-갈락토시데이즈(β-galactosidade)를 암호화하는 유전자는 각각 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*; NRRL: Y-8279) 에서 분리되어 상기 재조합 효모로 형질전환된 *LAC12* 유전자 및 *LAC4* 유전자인, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

[청구항 8] 제 5항에 있어서, 상기 *GRE3* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

[청구항 9] 제 6항에 있어서, 상기 *LAC12* 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

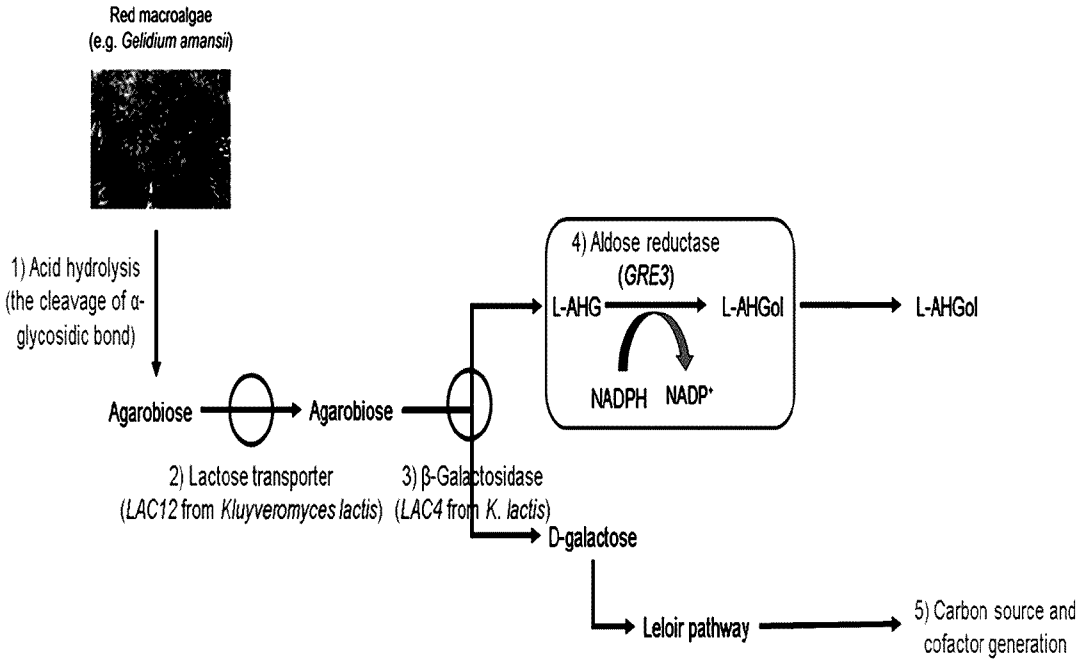
[청구항 10] 제 7항에 있어서, 상기 *LAC4* 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

[청구항 11] 제 1항에 있어서, 상기 재조합 효모는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 피치아 파스토리스(Pichia pastoris), 쉬조사카로마세스(Schizosa ccharomyces), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*), 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa), 야로위아 리폴리티카(Yarrowia lipolytica), 피치아 안거스타(Pichia angusta), 캔디다 보이디니이(Candida boidinii) 및 블라스토보트리스 아데니니포란스(Blastobotrys adeninivorans) 중 하나 이상인, 아가로바이오스를 기질로 사용하여 당 알코올을 생산하는 재조합 효모.

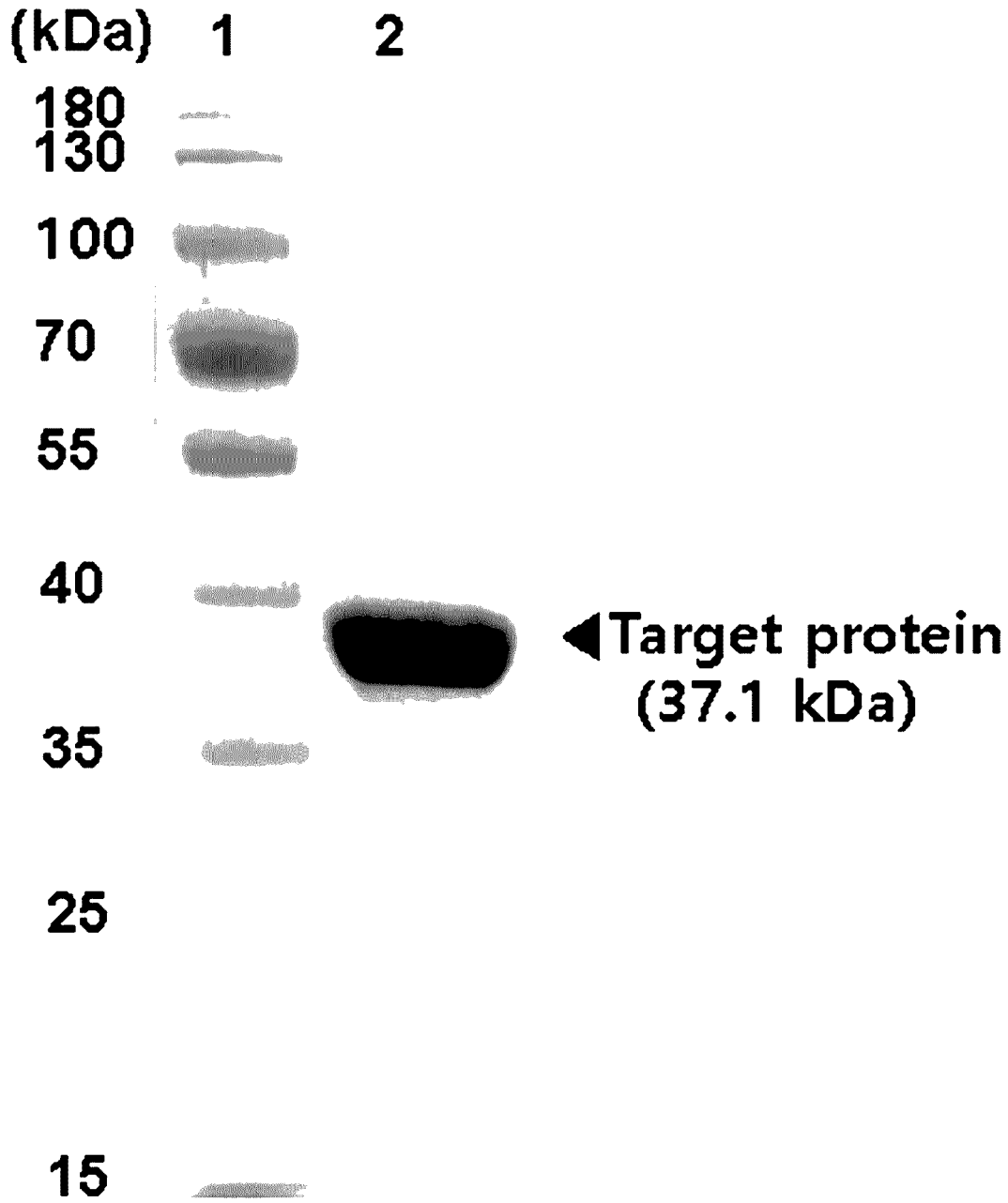
[청구항 12] 기질 및 탄소원을 사용하여 제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 따른 당 알코올을 생산하는 재조합 효모를 발효시키는 단계를 포함하는 당 알코올 생산 방법.

[청구항 13] 제 12항에 있어서,
상기 재조합 효모를 고농도 세포 배양하는 단계;
상기 기질인 아가로바이오스를 고농도로 제조하는 단계; 및
상기 고농도로 배양된 재조합 효모를 상기 생산된 고농도의 아가로바이오스 및 탄소원으로 D-Gal, D-Glc 및 락토오스 중 하나 이상을 사용하여 유가식 배양하여 발효시키는 단계를 포함하는, 당 알코올 생산 방법.

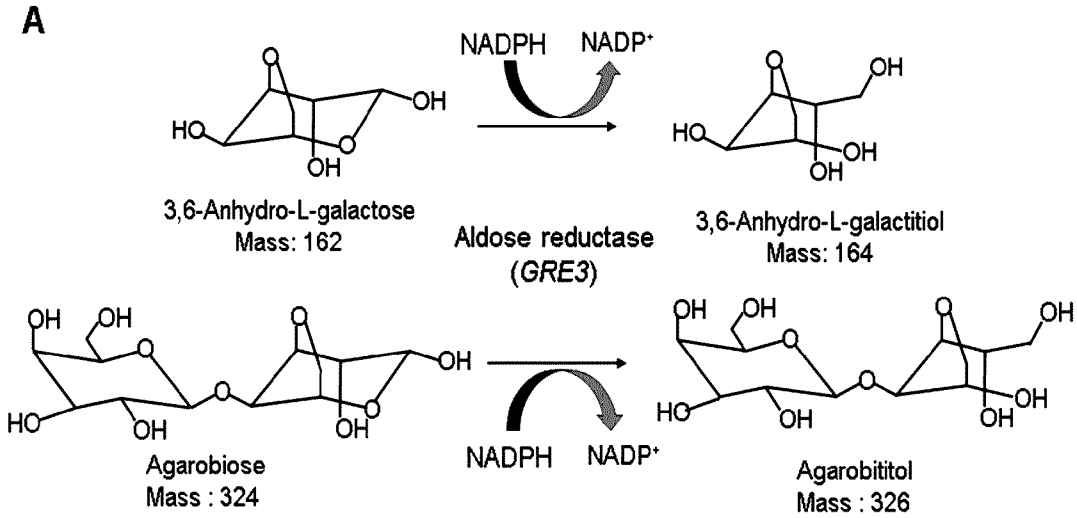
[도1]


Red macroalgae
(e.g. Gelidium amansii)
1) Acid hydrolysis
(the cleavage of α-glycosidic bond)
Agarobiose
Agarobiose
2) Lactose transporter
(LAC12 from Kluyveromyces lactis)
3) β-Galactosidase
(LAC4 from K. lactis)
4) Aldose reductase
(GRE3)
L-AHG
L-AHGol
NADPH
NADP+
L-AHGol
D-galactose
Leloir pathway
5) Carbon source and cofactor generation

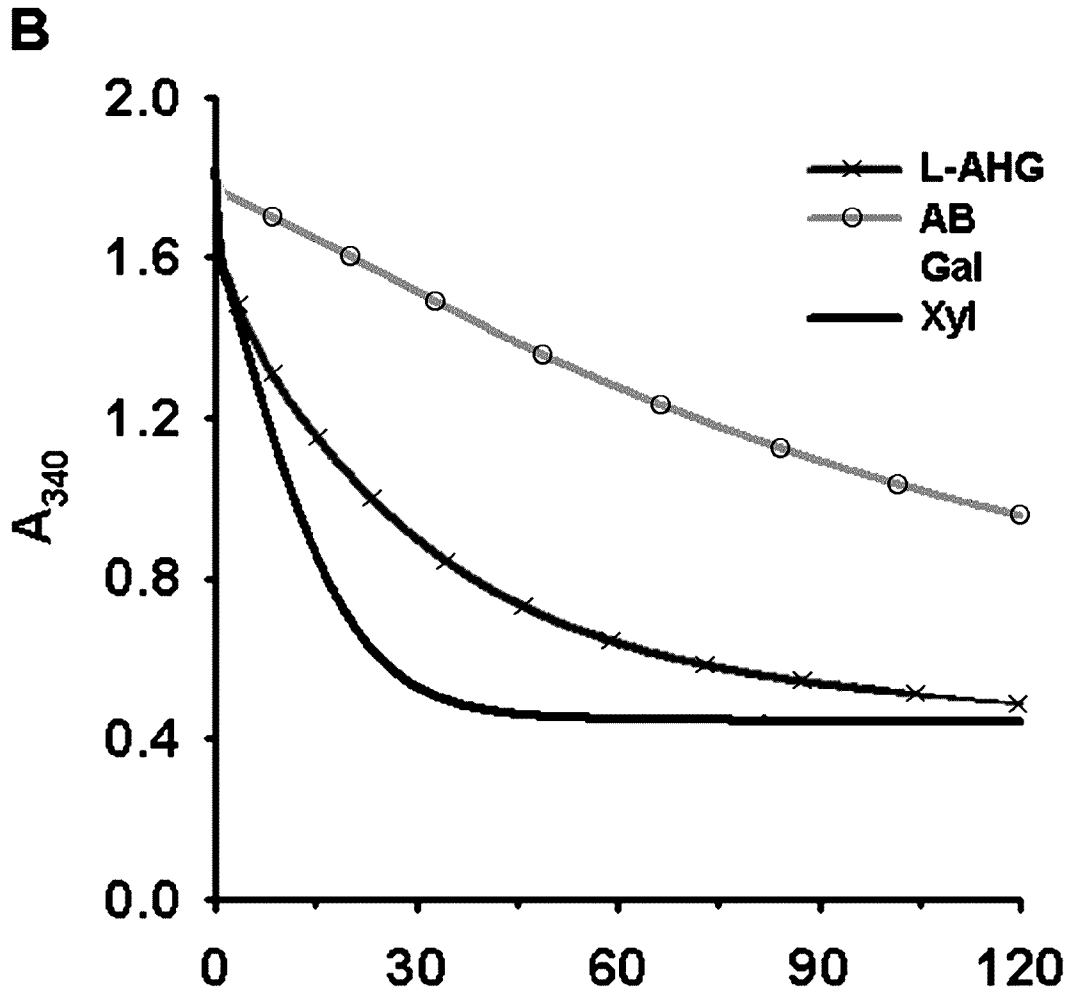
[도2]


(kDa)
1
2
180
130
100
70
55
40
35
25
15
Target protein
(37.1 kDa)

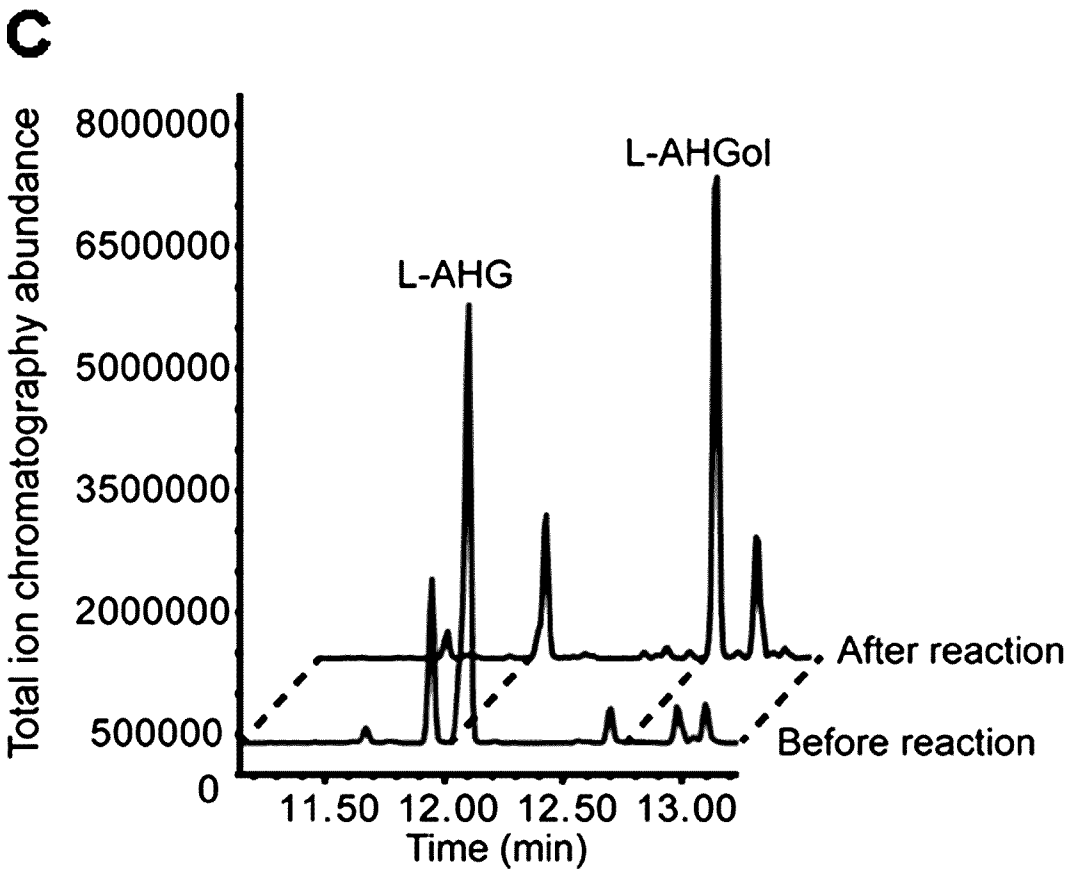
[도3a]


A
NADPH
NADP+
HO
OH
OH
3,6-Anhydro-L-galactose
Mass: 162
Aldose reductase
(GRE3)
3,6-Anhydro-L-galactitiol
Mass: 164
Agarobiose
Mass : 324
NADPH
NADP+
Agarobititol
Mass : 326

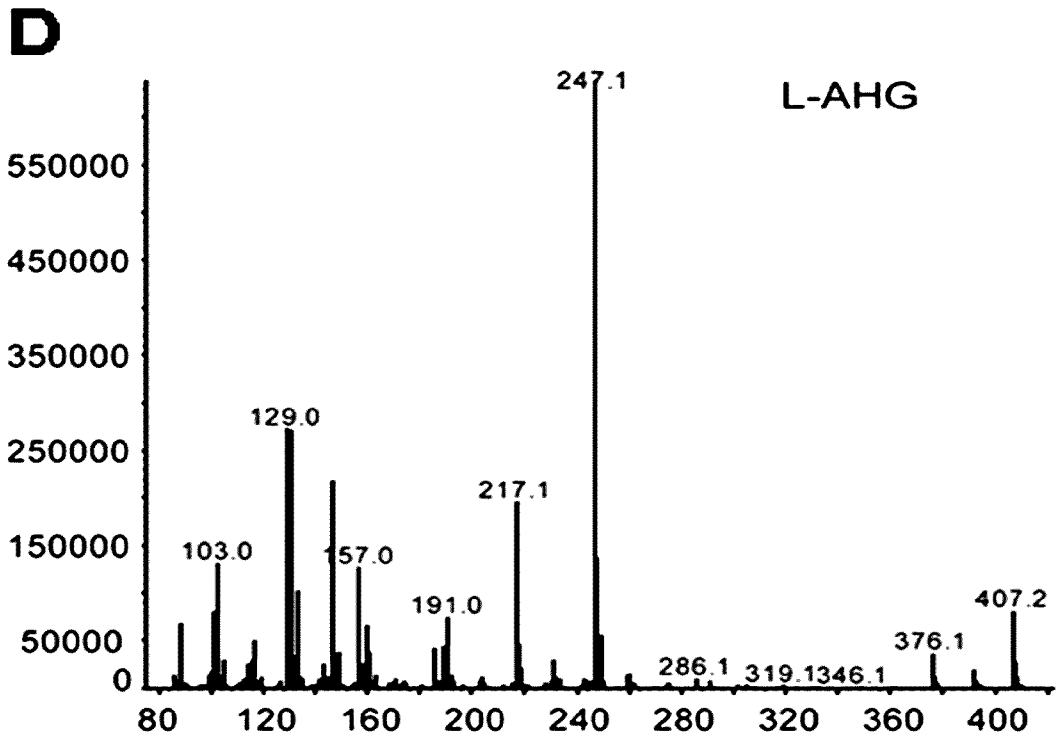
[도3b]


B
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
A_{340}
0
30
60
90
120
L-AHG
AB
Gal
Xyl

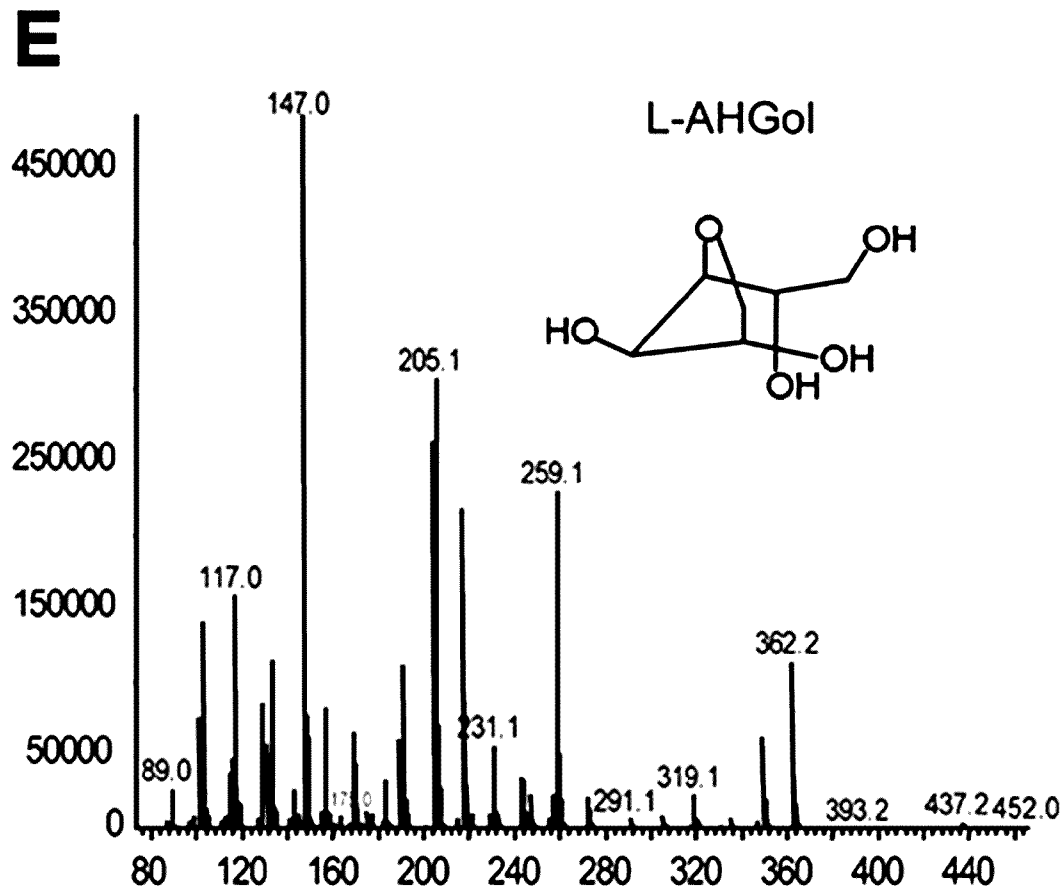
[도3c]


C
Total ion chromatography abundance
8000000
6500000
5000000
3500000
2000000
500000
0
11.50
12.00
12.50
13.00
Time (min)
L-AHG
L-AHGol
After reaction
Before reaction

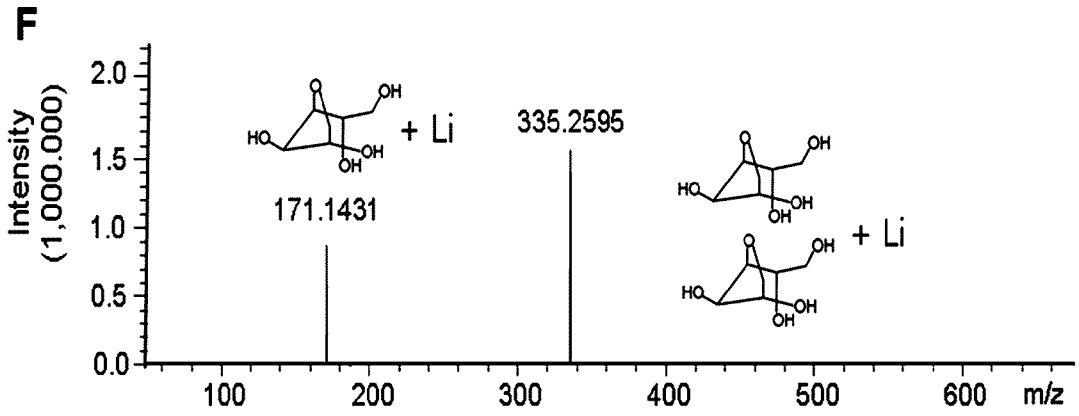
[도3d]


D
L-AHG
247.1
550000
450000
350000
250000
150000
50000
0
129.0
217.1
103.0
157.0
191.0
407.2
376.1
286.1
319.1
346.1
80
120
160
200
240
280
320
360
400

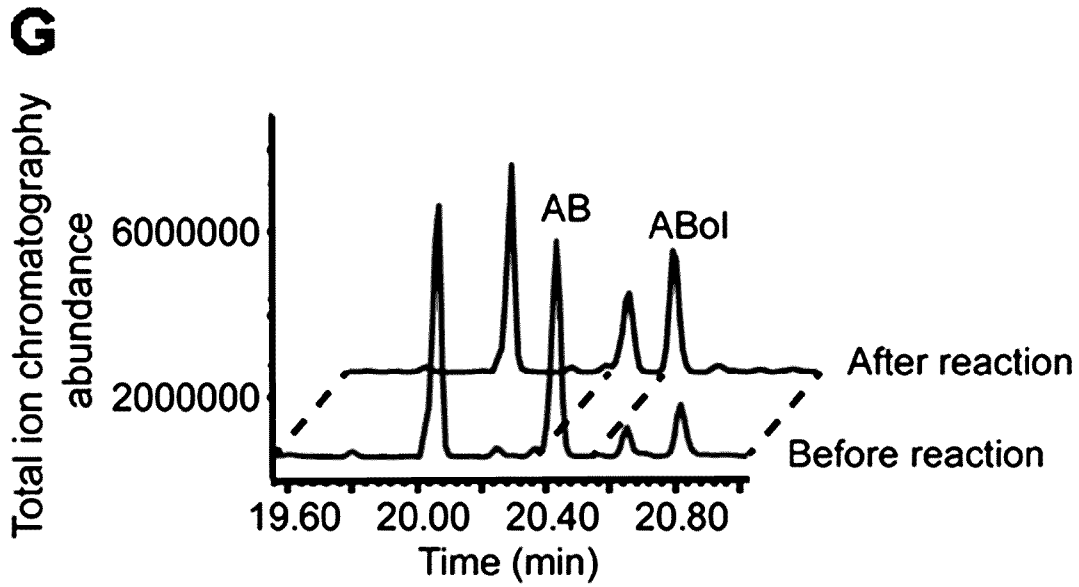
[도3e]


E
L-AHGol
147.0
450000
350000
250000
150000
50000
0
205.1
259.1
117.0
362.2
231.1
89.0
319.1
291.1
393.2
437.2
452.0
OH
HO
OH
OH
80
120
160
200
240
280
320
360
400
440

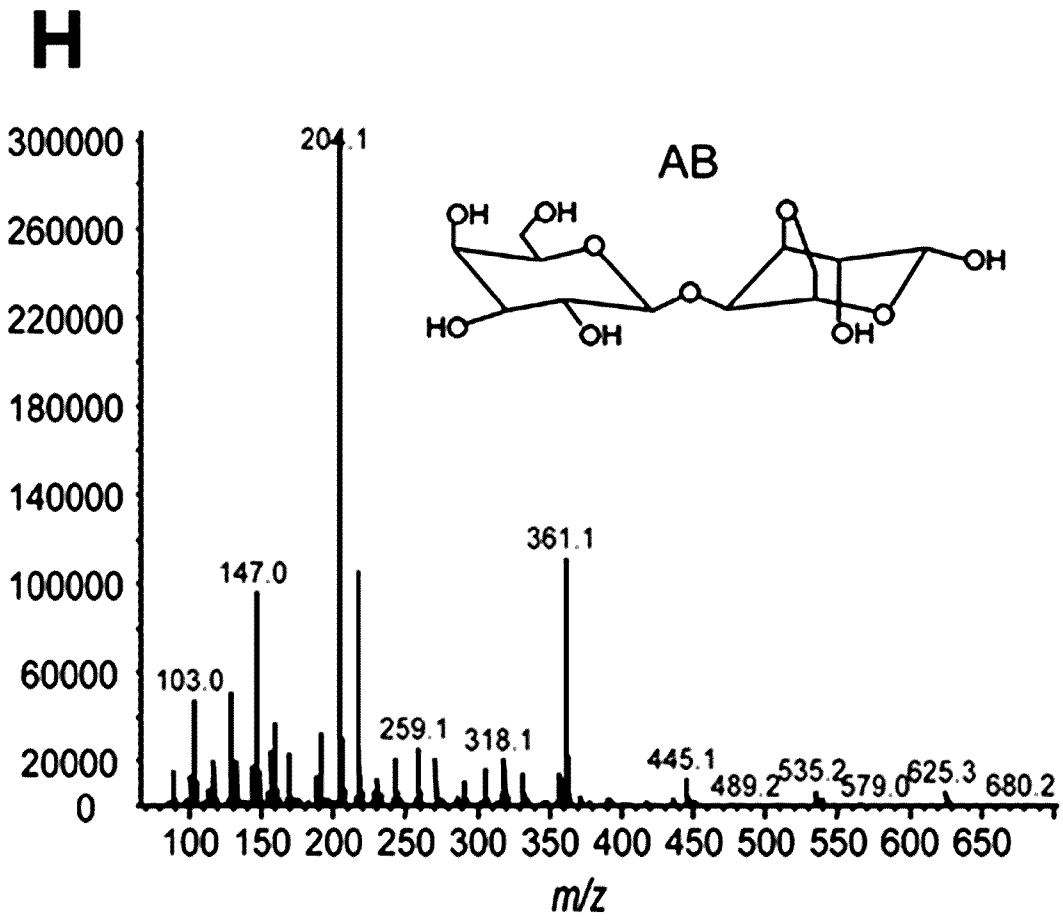
[도3f]


F
Intensity (1,000,000)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
100
200
300
400
500
600
m/z
+ Li
171.1431
335.2595
+ Li

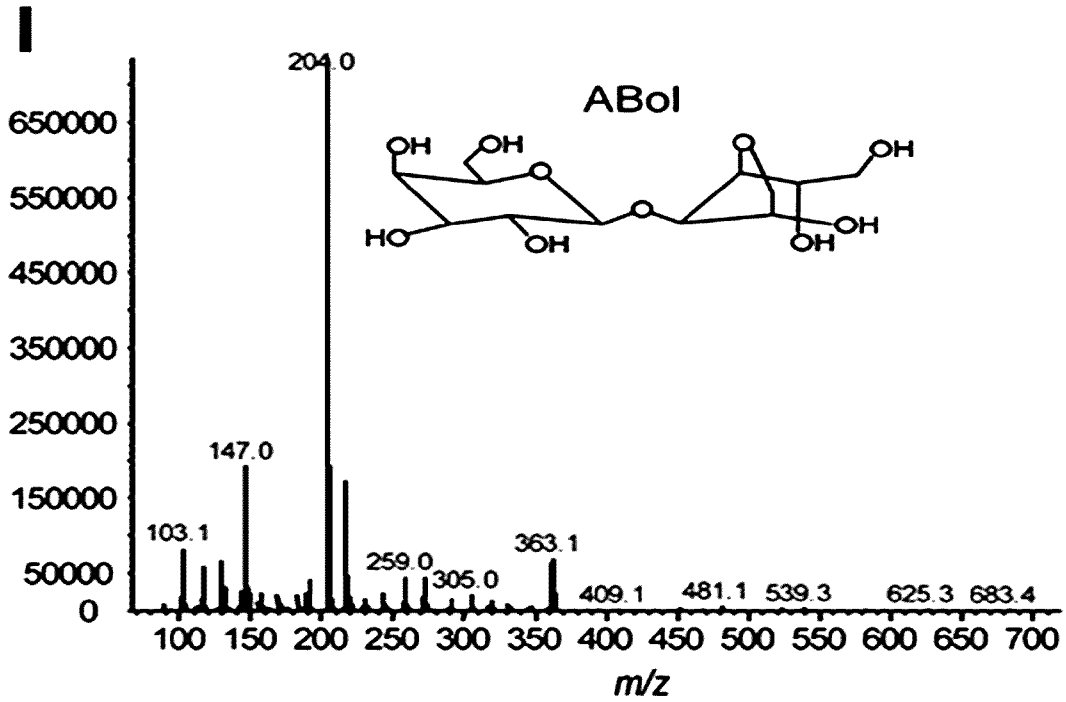
[도3g]


G
Total ion chromatography abundance
6000000
2000000
AB
ABol
After reaction
Before reaction
19.60
20.00
20.40
20.80
Time (min)

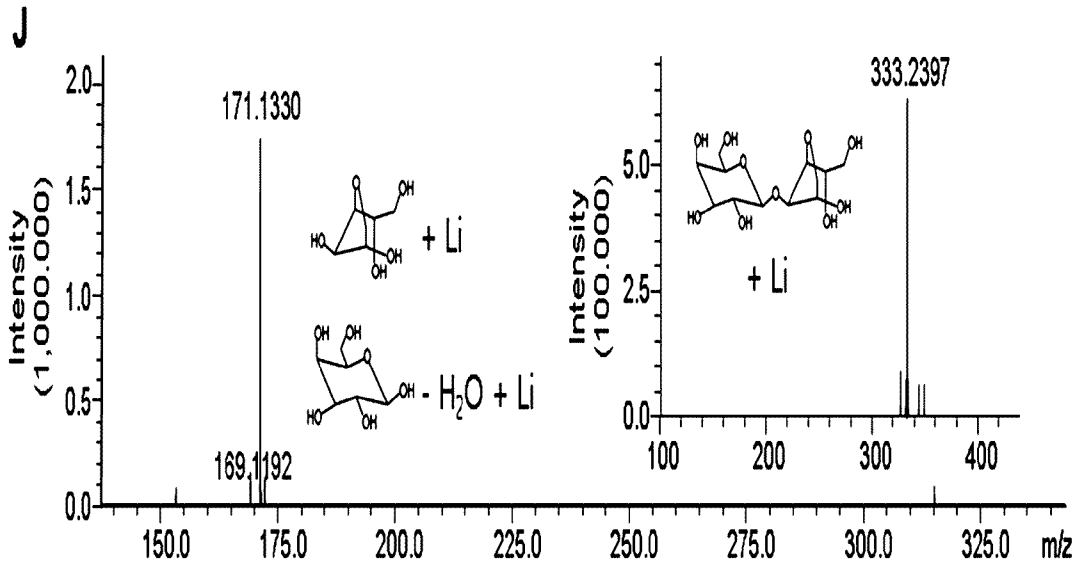
[도3h]


H
AB
204.1
361.1
147.0
103.0
259.1
318.1
445.1
489.2
535.2
579.0
625.3
680.2
300000
260000
220000
180000
140000
100000
60000
20000
0
100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650
m/z

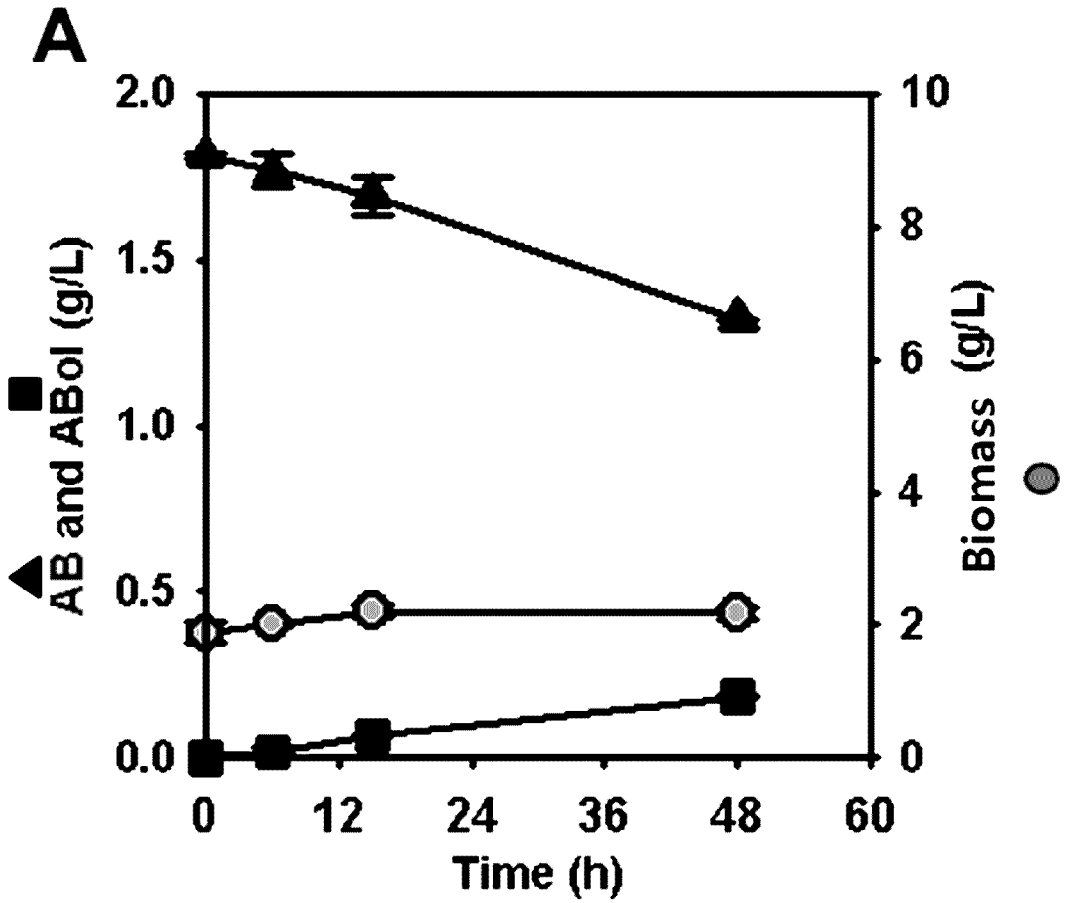
[도3i]


I
ABol
204.0
147.0
103.1
259.0
305.0
363.1
409.1
481.1
539.3
625.3
683.4
650000
550000
450000
350000
250000
150000
50000
0
100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700
m/z

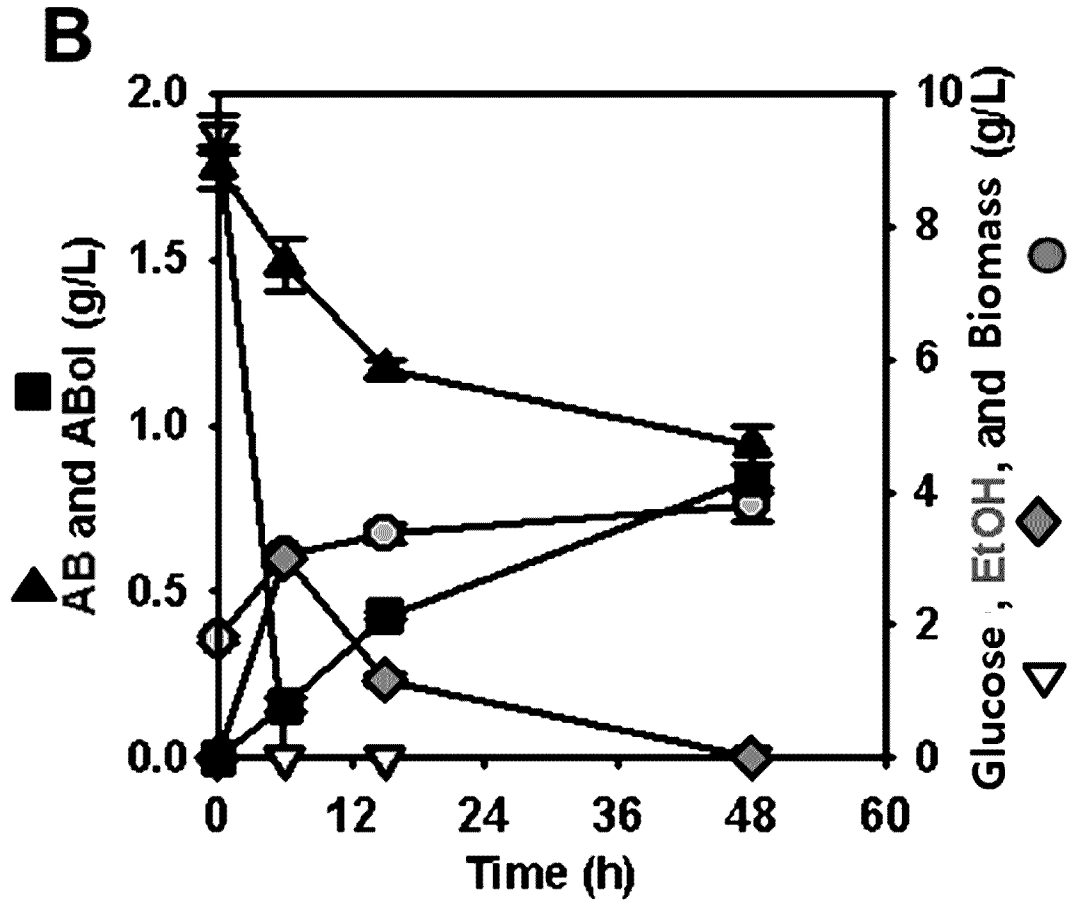
[도3j]


J
Intensity (1,000,000)
171.1330
169.1192
+ Li
- H2O + Li
Intensity (100,000)
333.2397
+ Li
m/z

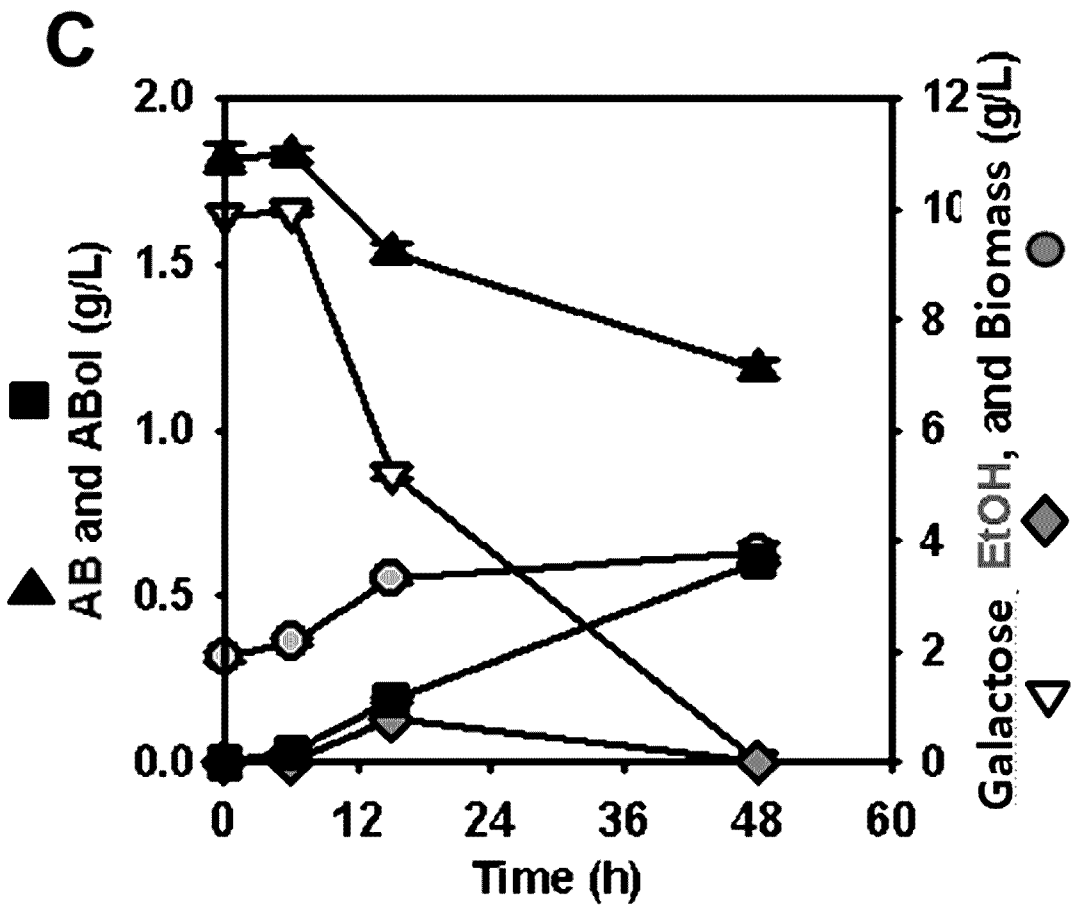
[도4a]


A
AB and ABol (g/L)
Biomass (g/L)
Time (h)

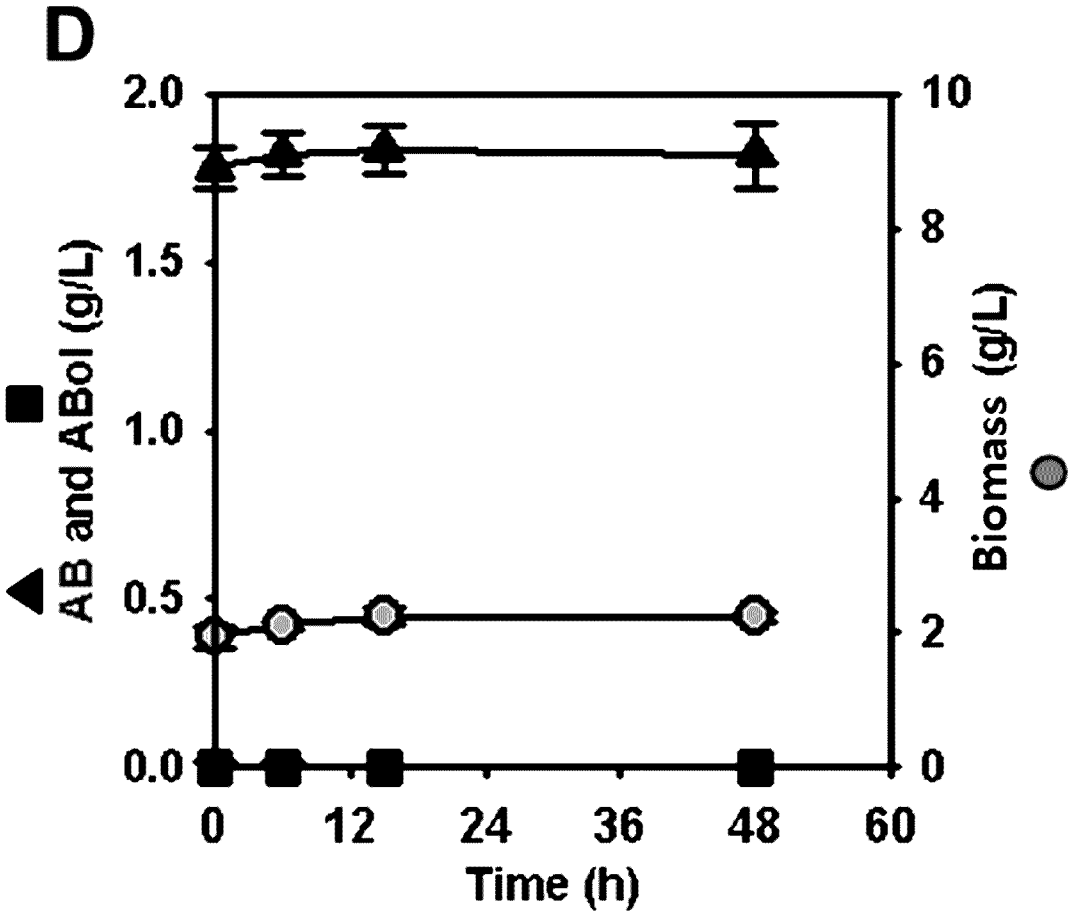
[도4b]


B
AB and ABol (g/L)
Glucose , EtOH, and Biomass (g/L)
Time (h)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
2
4
6
8
10
0
12
24
36
48
60

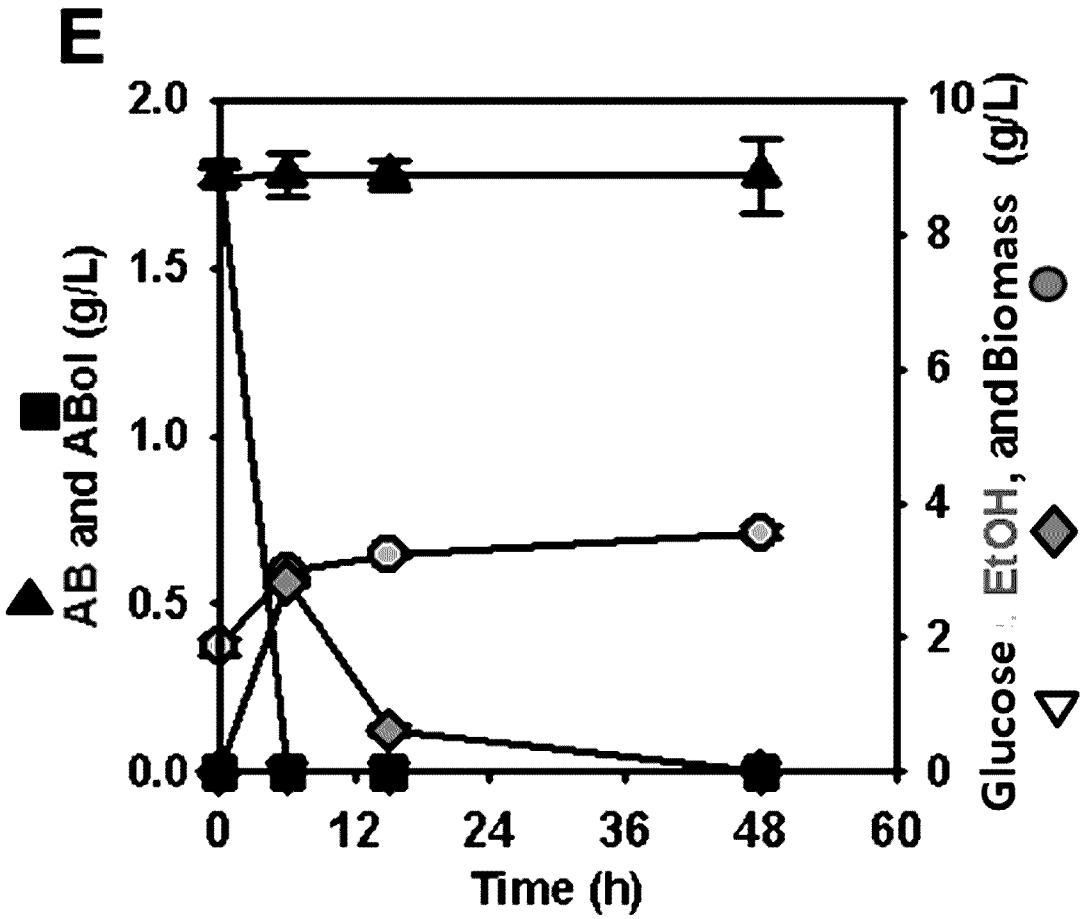
[도4c]


C
AB and ABol (g/L)
Galactose , EtOH, and Biomass (g/L)
Time (h)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
2
4
6
8
10
12
0
12
24
36
48
60

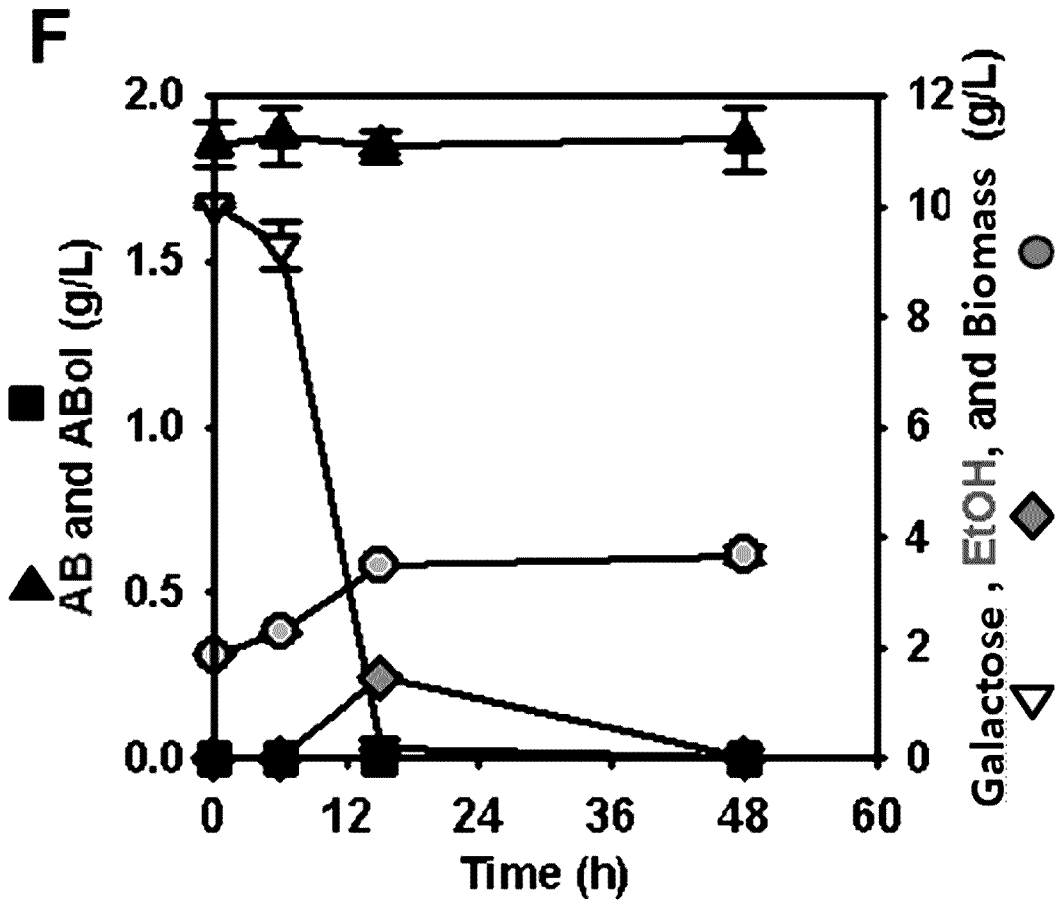
[도4d]


D
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
AB and ABol (g/L)
10
8
6
4
2
0
Biomass (g/L)
0
12
24
36
48
60
Time (h)

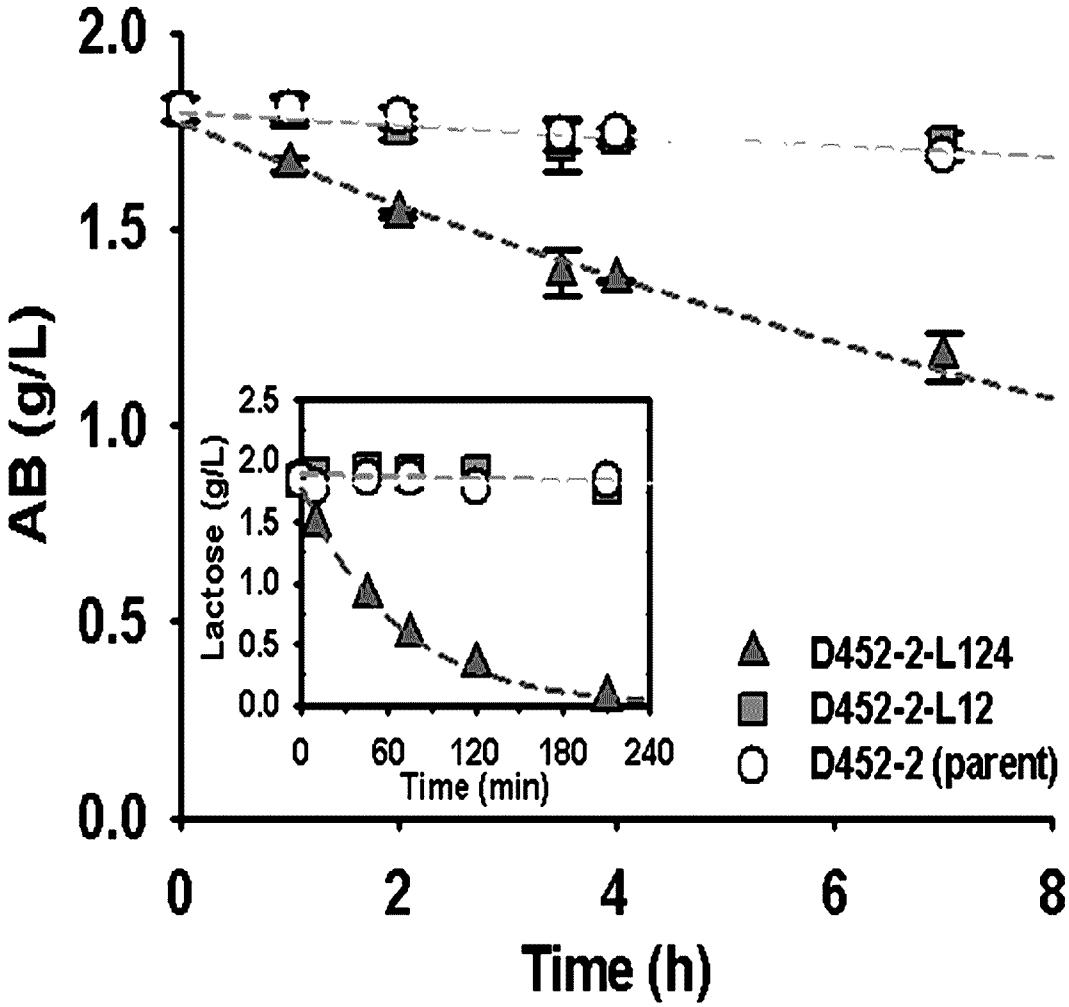
[도4e]


E
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
AB and ABol (g/L)
10
8
6
4
2
0
Glucose , EtOH, and Biomass (g/L)
0
12
24
36
48
60
Time (h)

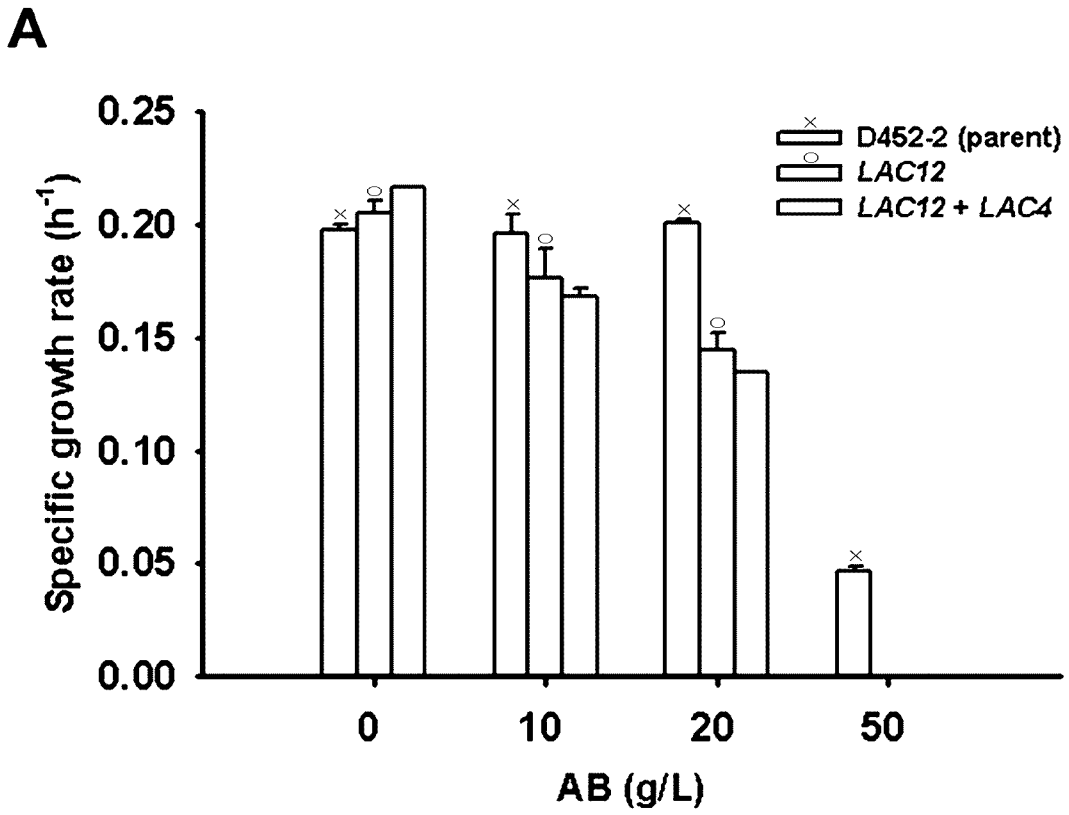
[도4f]


F
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
AB and ABol (g/L)
12
10
8
6
4
2
0
Galactose , EtOH, and Biomass (g/L)
0
12
24
36
48
60
Time (h)

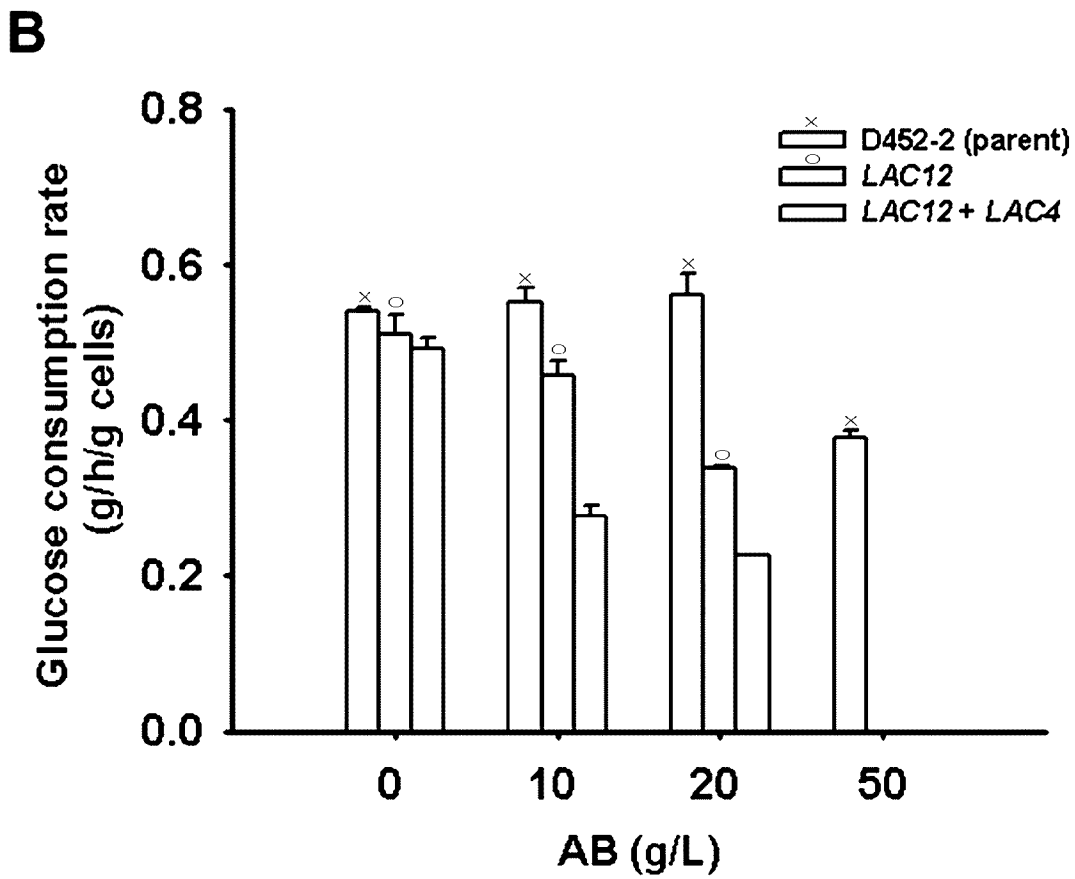
[도5]


AB (g/L)
Time (h)
Lactose (g/L)
Time (min)
D452-2-L124
D452-2-L12
D452-2 (parent)

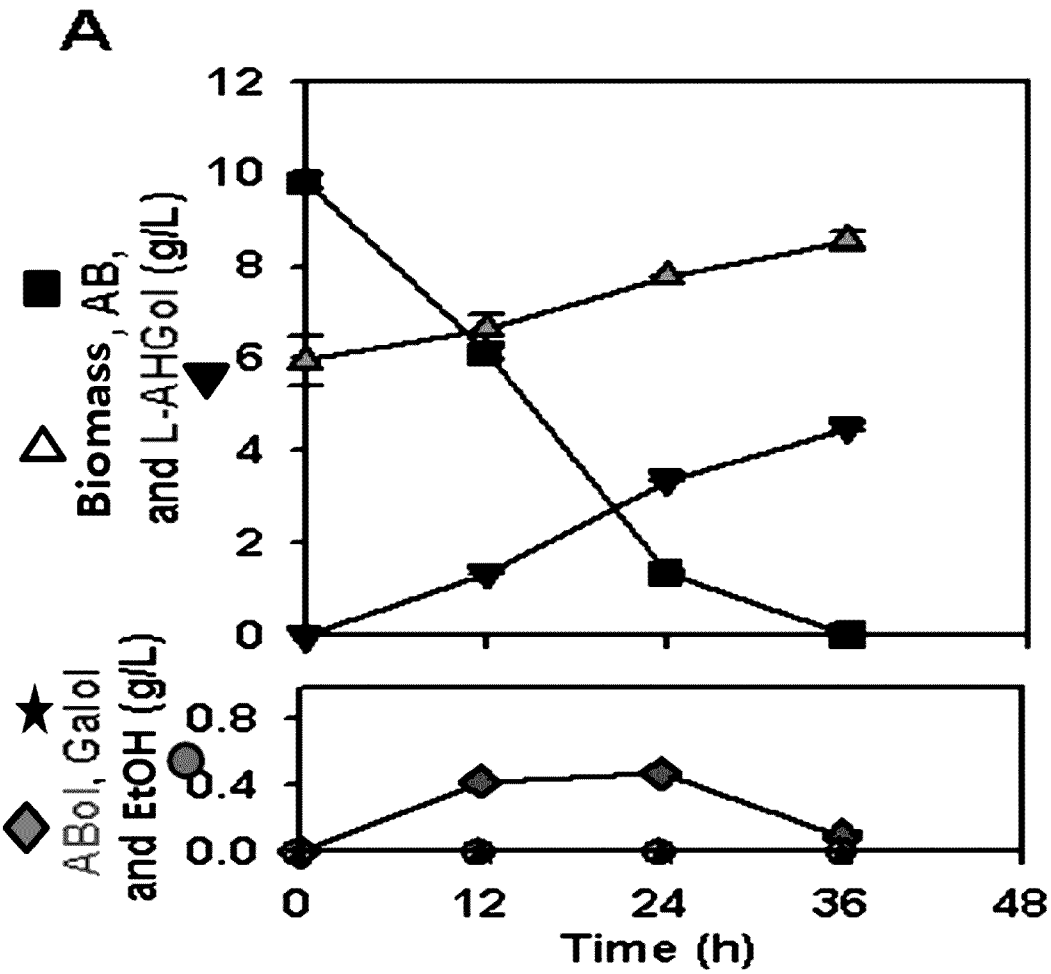
[도6a]


A
Specific growth rate (h-1)
AB (g/L)
D452-2 (parent)
LAC12
LAC12 + LAC4

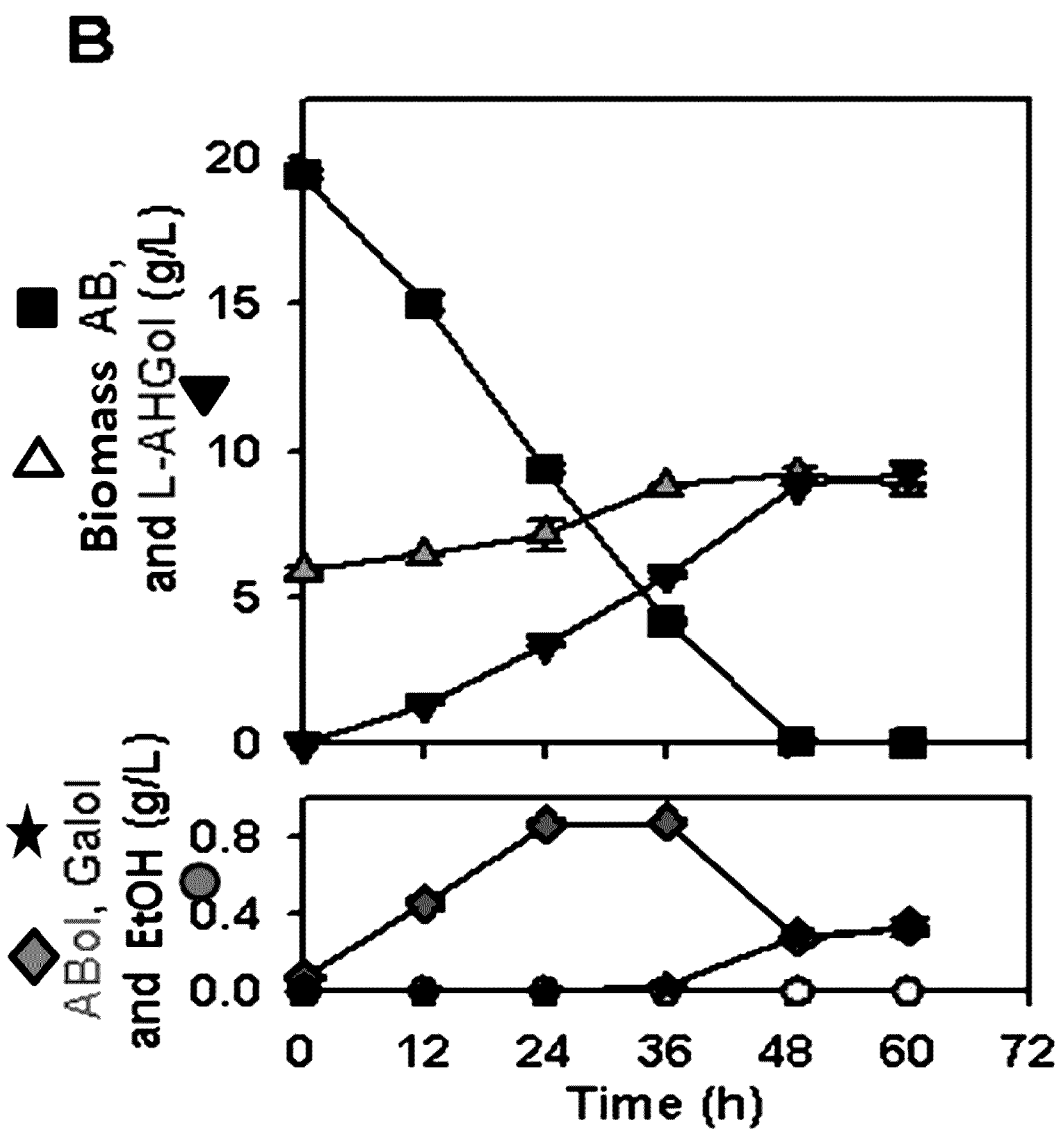
[도6b]


B
Glucose consumption rate (g/h/g cells)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
D452-2 (parent)
LAC12
LAC12 + LAC4
0
10
20
50
AB (g/L)

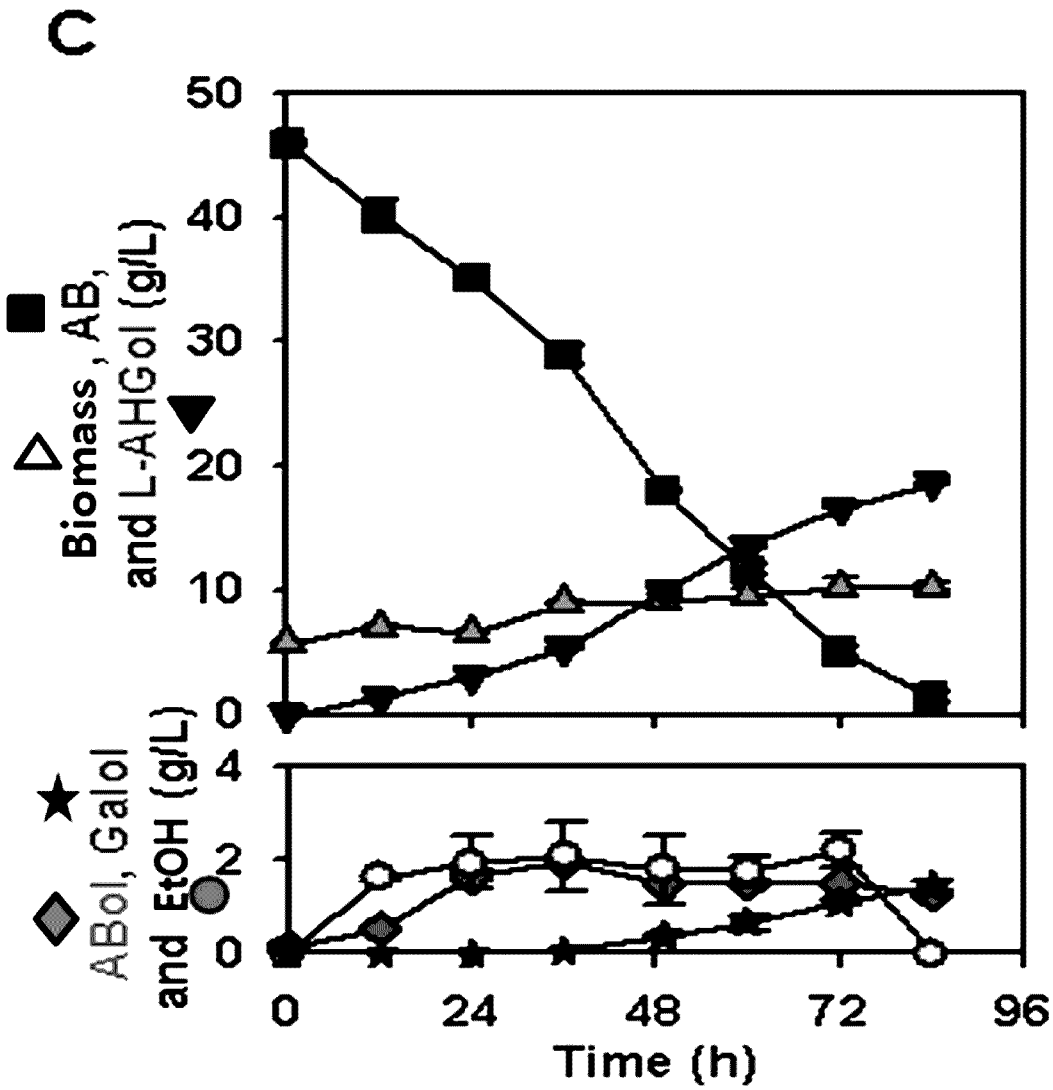
[도7a]


A
Biomass, AB, and L-AHGol (g/L)
12
10
8
6
4
2
0
ABol, Galol and EtOH (g/L)
0.8
0.4
0.0
0
12
24
36
48
Time (h)

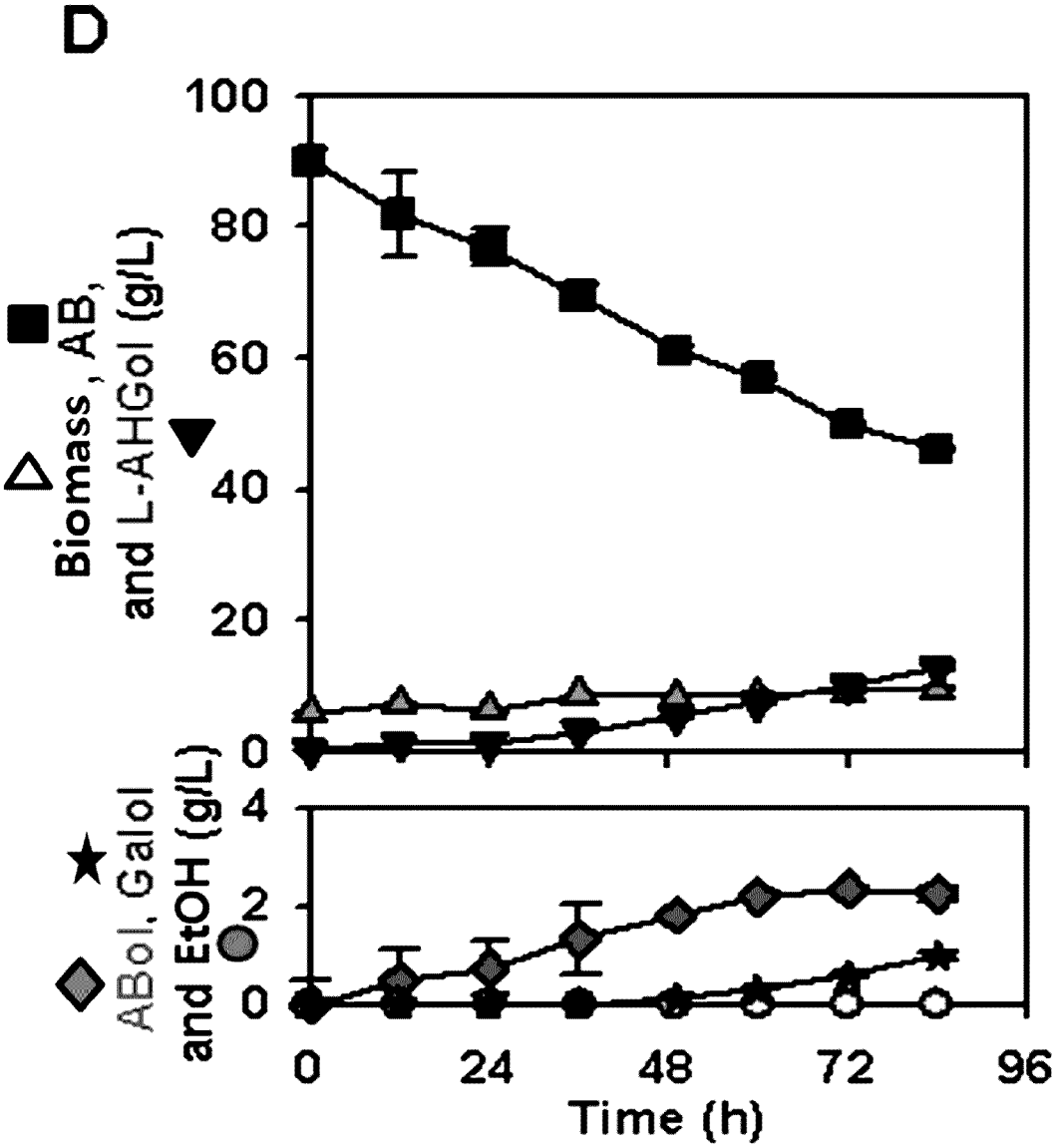
[도7b]


B
Biomass AB, and L-AHGol (g/L)
ABol, Galol and EtOH (g/L)
Time (h)
0
5
10
15
20
0.0
0.4
0.8
0
12
24
36
48
60
72

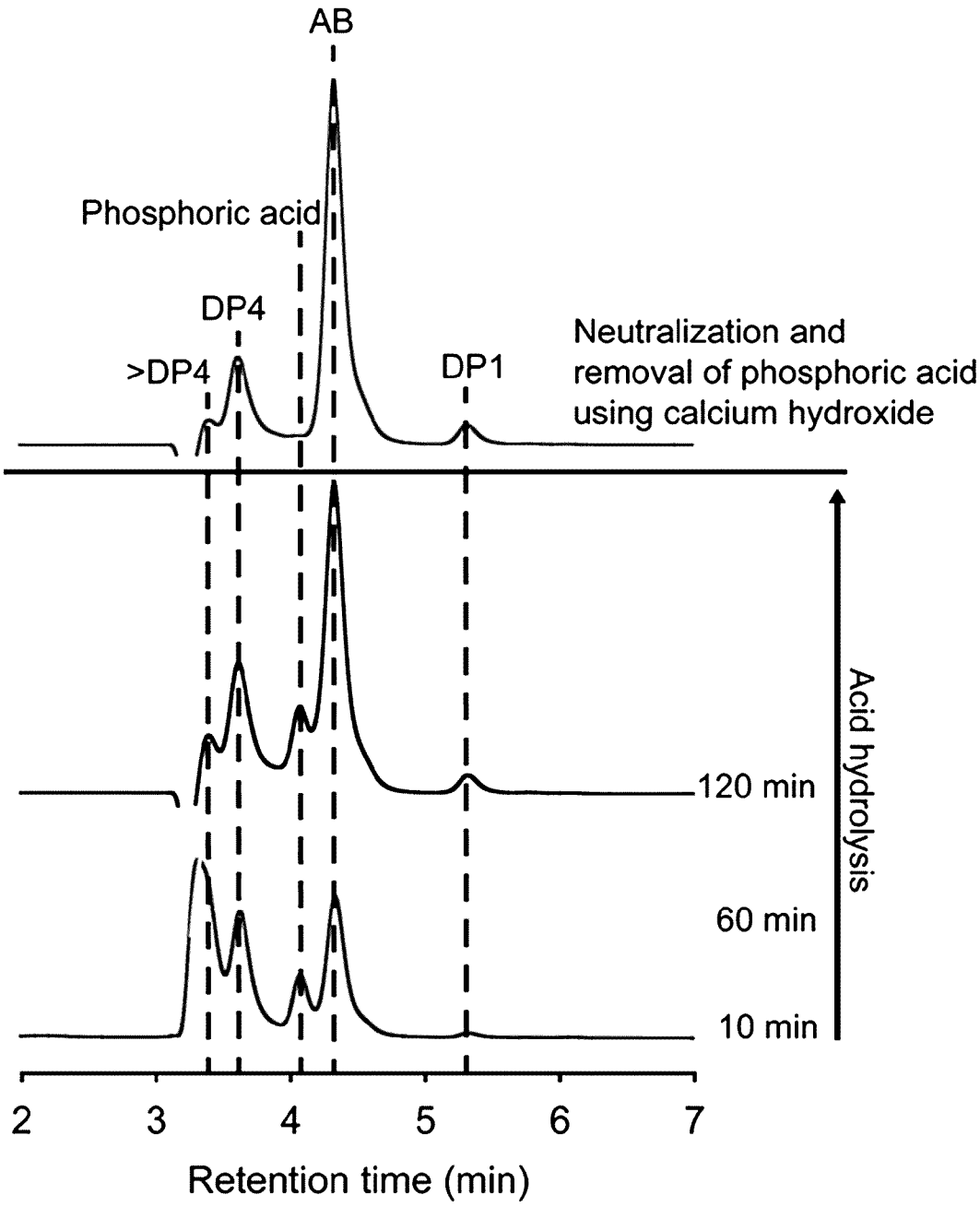
[도7c]


C
50
40
30
20
10
0
Biomass , AB,
and L-AHGol (g/L)
4
2
0
ABol, Galol
and EtOH (g/L)
0
24
48
72
96
Time (h)

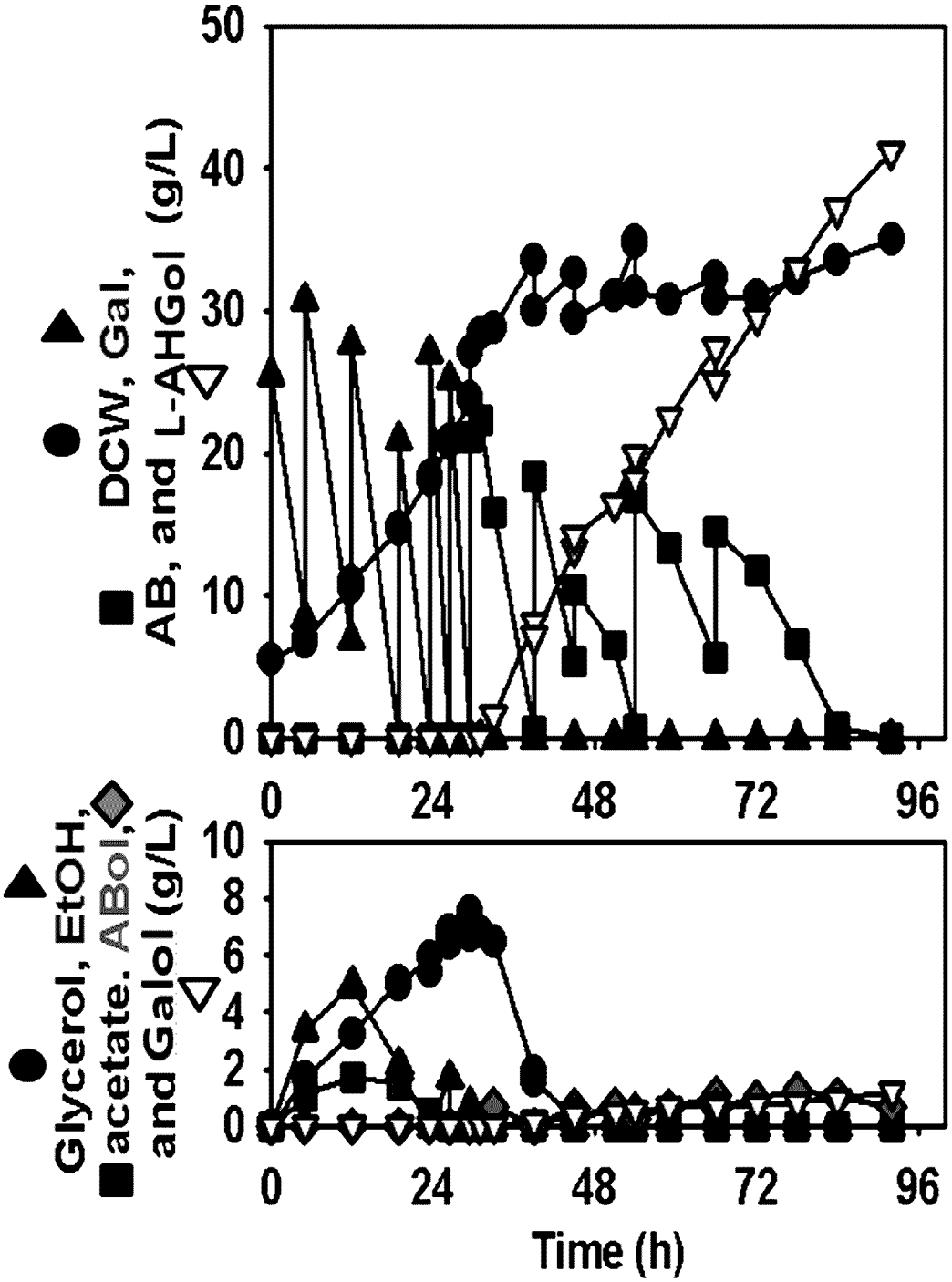
[도7d]


D
Biomass, AB, and L-AHGol (g/L)
ABol, Galol and EtOH (g/L)
Time (h)
0
24
48
72
96
100
80
60
40
20
0
4
2
0

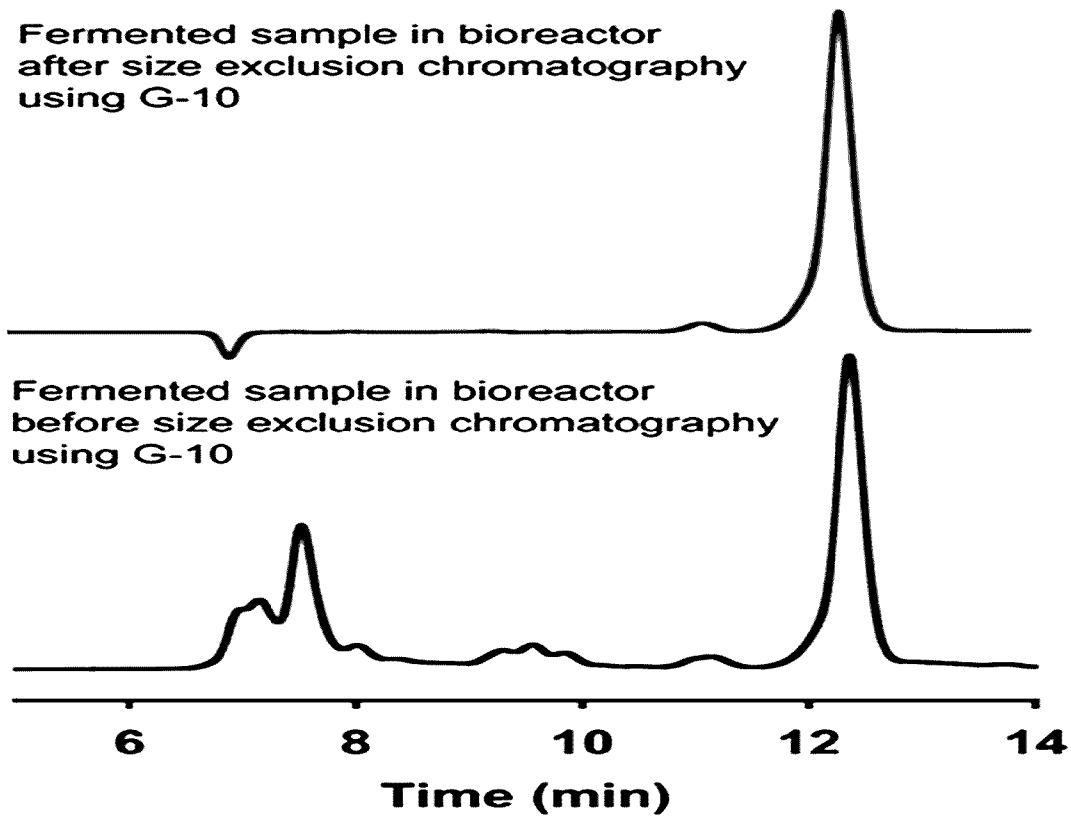
[도8]


AB
Phosphoric acid
DP4
>DP4
DP1
Neutralization and
removal of phosphoric acid
using calcium hydroxide
120 min
60 min
10 min
Acid hydrolysis
2
3
4
5
6
7
Retention time (min)

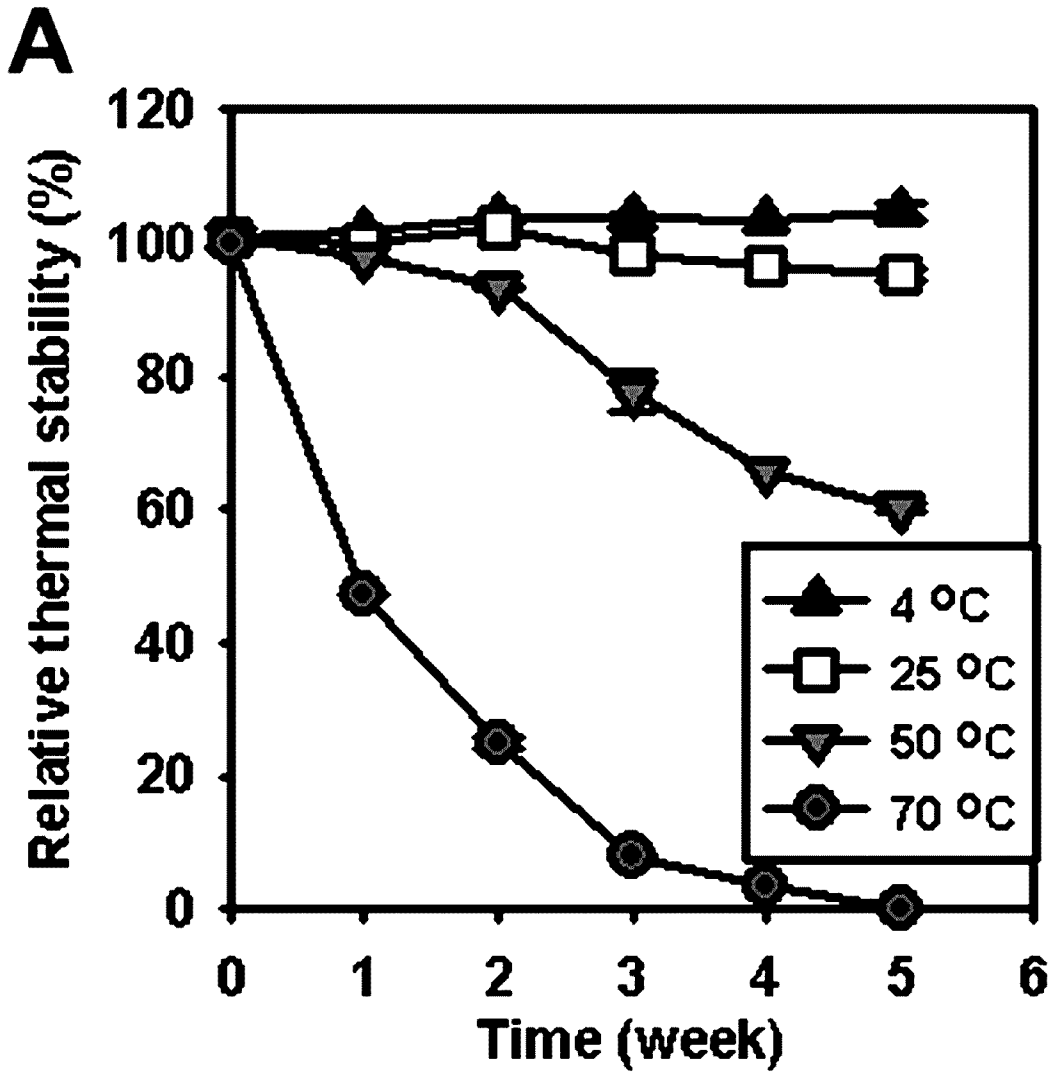
[도9]


DCW, Gal, AB, and L-AHGol (g/L)
Glycerol, EtOH, acetate, ABol, and Galol (g/L)
Time (h)
0
10
20
30
40
50
0
2
4
6
8
10
0
24
48
72
96

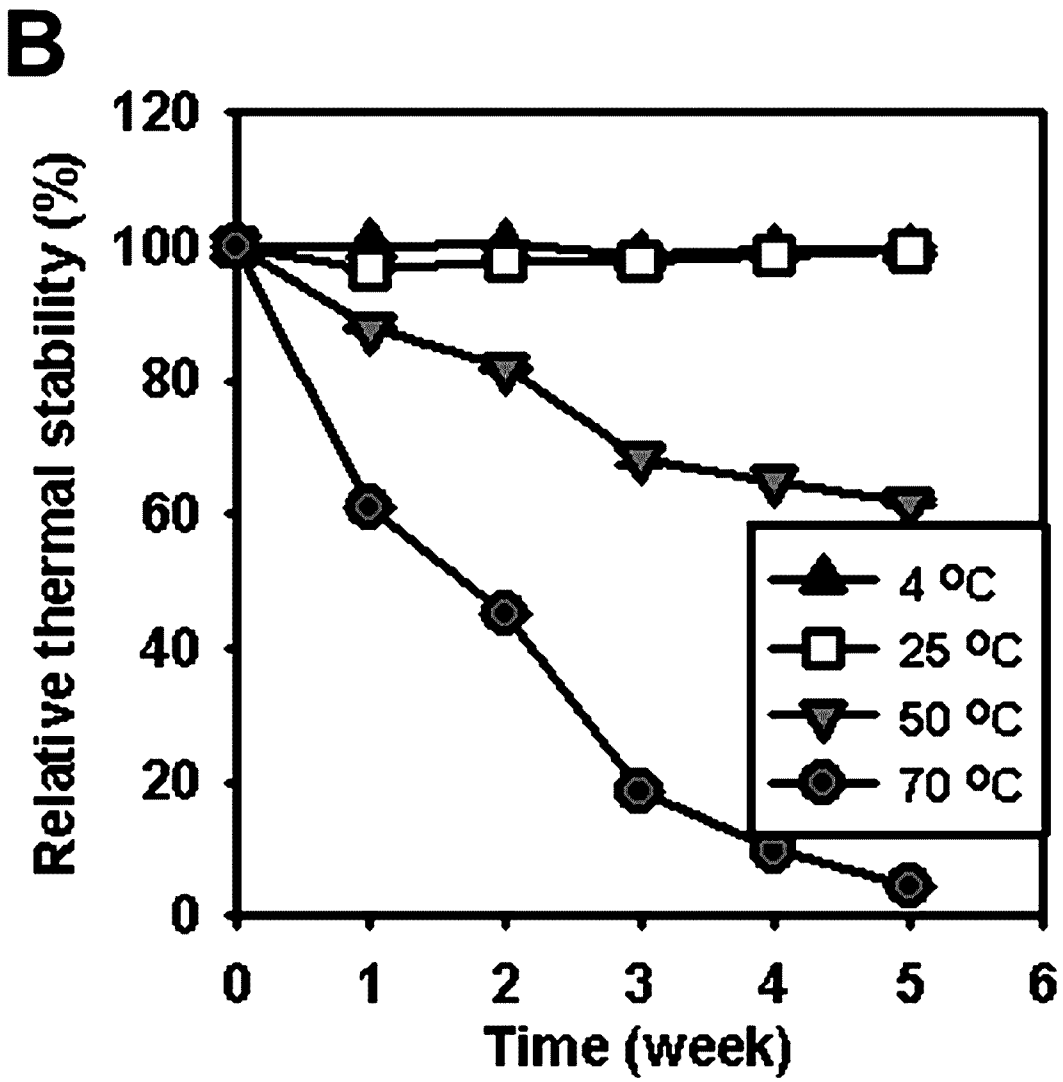
[도10]


Fermented sample in bioreactor after size exclusion chromatography using G-10
Fermented sample in bioreactor before size exclusion chromatography using G-10
6
8
10
12
14
Time (min)

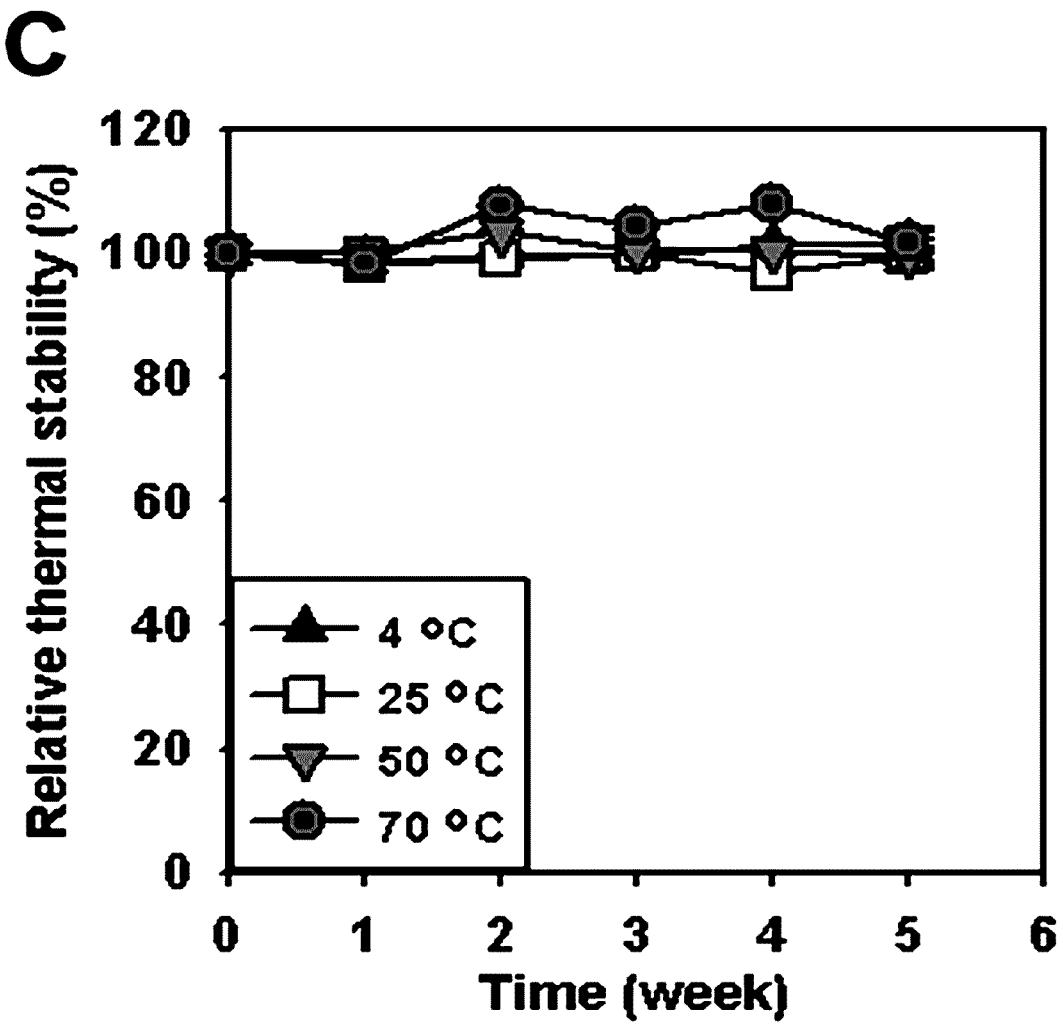
[도11a]


A
Relative thermal stability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Time (week)
4 °C
25 °C
50 °C
70 °C

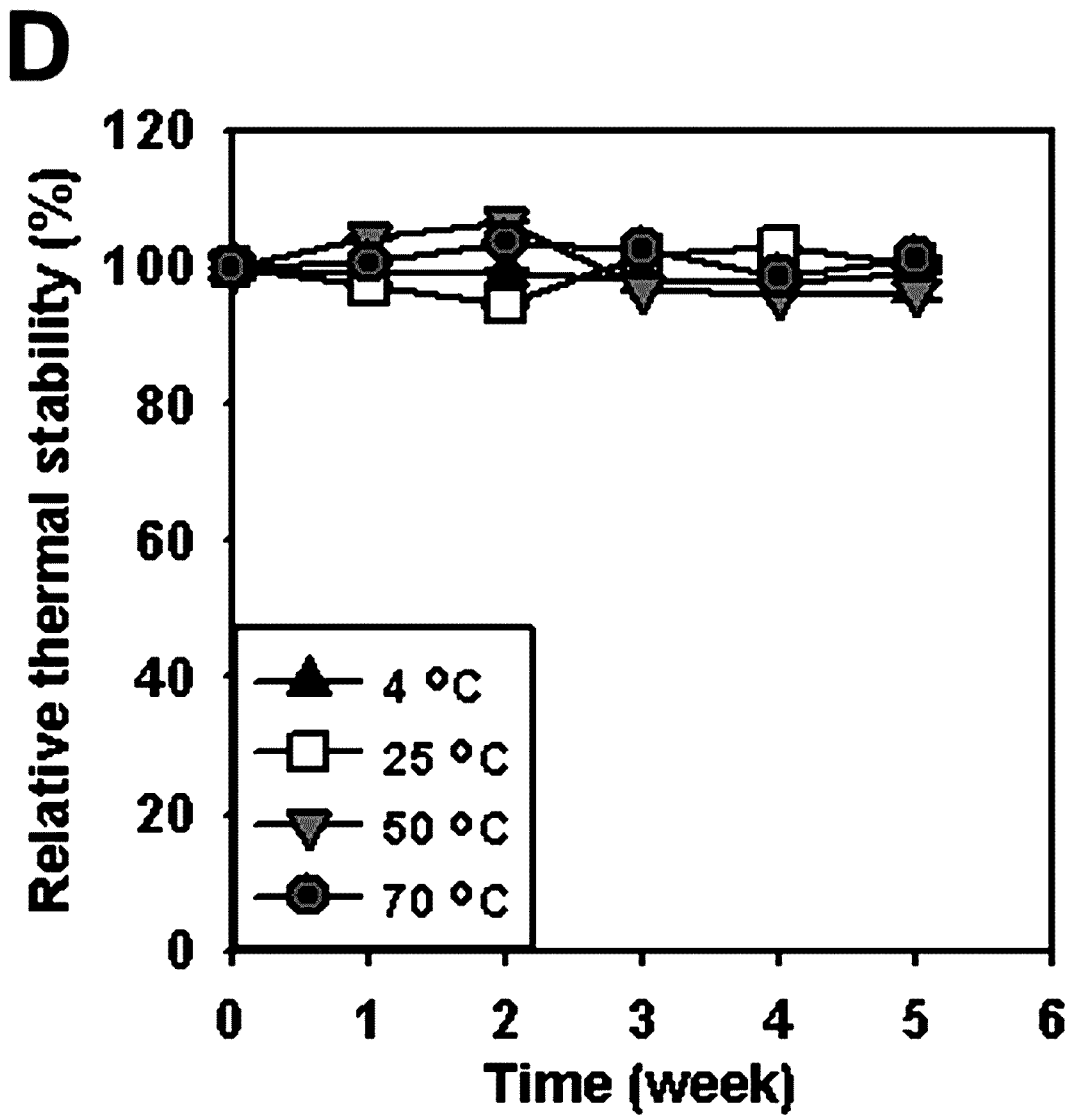
[도11b]


B
Relative thermal stability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
Time (week)
4 °C
25 °C
50 °C
70 °C

[도11c]


C
Relative thermal stability (%)
120
100
80
60
40
20
0
4 °C
25 °C
50 °C
70 °C
0
1
2
3
4
5
6
Time (week)

[도11d]


D
Relative thermal stability (%)
120
100
80
60
40
20
0
4 °C
25 °C
50 °C
70 °C
0
1
2
3
4
5
6
Time (week)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/011505

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/81(2006.01)i, C12N 9/04(2006.01)i, C12N 9/38(2006.01)i, C07K 14/195(2006.01)i, C12P 7/18(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 15/81; C12N 9/04; C12N 9/38; C07K 14/195; C12P 7/18

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: agar, recombinant yeast, galactitol, GRE3, LAC12, LAC4, AHG, AHGo1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MASUDA, C. A. et al. Overexpression of the aldose reductase GRE 3 suppresses lithium-induced galactose toxicity in Saccharomyces cerevisiae. FEMS yeast research. 2008(Electronic publication on 22 September 2008), vol. 8, pages 1245-1253 See abstract.	1-13
A	VARELA, J. A. et al. Polymorphisms in the LAC12 gene explain lactose utilisation variability in Kluyveromyces marxianus strains. FEMS yeast research. 2017, vol. 17, no. 3, pages 1-13 See abstract.	1-13
A	NCBI. GenBank accession no. NM_001179234.1. Saccharomyces cerevisiae S288c trifunctional aldehyde reductase/xylose reductase/glucose1-dehydrogenase (NADP(+)) (GRE3), partial mRNA. 15 March 2017 See the entire document.	1-13
A	NCBI. GenBank accession no. X06997.1. Kluyveromyces lactis LAC12 gene for lactose permease. 25 July 2016 See the entire document.	1-13
A	NCBI. GenBank accession no. M84410.1. Kluyveromyces lactis beta-D-galactosidase (LAC4) gene, complete cds. 27 April 1993 See the entire document.	1-13

☐ 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

"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
07 JANUARY 2020 (07.01.2020)	**08 JANUARY 2020 (08.01.2020)**

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, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/011505

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
None			

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2019/011505

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/81(2006.01)i, C12N 9/04(2006.01)i, C12N 9/38(2006.01)i, C07K 14/195(2006.01)i, C12P 7/18(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 15/81; C12N 9/04; C12N 9/38; C07K 14/195; C12P 7/18

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:한천 (agar), 재조합 효모 (recombinant yeast), 갈락티톨 (gallactitol), GRE3, LAC12, LAC4, AHG, AHGol

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MASUDA, C. A. 등, 'Overexpression of the aldose reductase GRE 3 suppresses lithium-induced galactose toxicity in Saccharomyces cerevisiae', FEMS yeast research, 2008(전자공개 2008.09.22), 8권, 페이지 1245-1253 초록	1-13
A	VARELA, J. A. 등, 'Polymorphisms in the LAC12 gene explain lactose utilisation variability in Kluyveromyces marxianus strains', FEMS yeast research, 2017, 17권, 3호, 페이지 1-13 초록	1-13
A	NCBI, GenBank accession no. NM_001179234.1, 'Saccharomyces cerevisiae S288c trifunctional aldehyde reductase/xylose reductase/glucose1-dehydrogenase (NADP(+)) (GRE3), partial mRNA', 2017.03.15 전체 문헌	1-13
A	NCBI, GenBank accession no. X06997.1, 'Kluyveromyces lactis LAC12 gene for lactose permease', 2016.07.25 전체 문헌	1-13
A	NCBI, GenBank accession no. M84410.1, 'Kluyveromyces lactis beta-D-galactosidase (LAC4) gene, complete cds', 1993.04.27 전체 문헌	1-13

☐ 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
2020년 01월 07일 (07.01.2020)	2020년 01월 08일 (08.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/011505

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음