

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2020년 10월 29일 (29.10.2020) WIPO | PCT

WO 2020/218876 A1

- (51) 국제특허분류:
C12P 19/04 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/005439
- (22) 국제출원일: 2020년 4월 24일 (24.04.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0049226 2019년 4월 26일 (26.04.2019) 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). 진용수 (JIN, Yong Su); 61822 일리노이주 샴페인 샌드힐 Ln 3005, Illinois (US). 윤은주 (YUN, Eun Ju); 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 김인정 (KIM, In Jeong); 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 한형민 (HAN, Hyeong Min); 07694 서울시 강서구 우현로 67, 118동 1404호, Seoul (KR). 유소라 (YU, So Ra); 12285

경기도 남양주시 다산중앙로82번길 15, 5108동 1404호, Gyeonggi-do (KR).

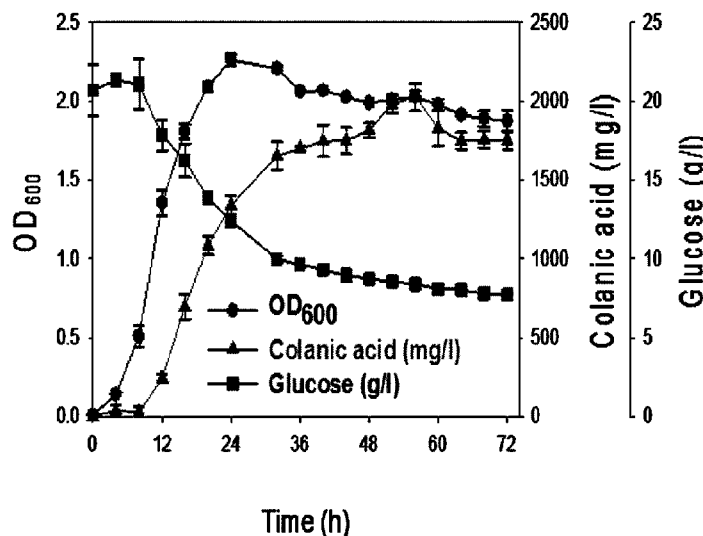
(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).

(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, 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 국내 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

(54) Title: COLANIC ACID PRODUCTION USING MUTANT E. COLI

(54) 발명의 명칭: 돌연변이 대장균을 이용한 콜라닉 산 생산



(57) Abstract: The present invention pertains to a strain culture medium composition for mass-producing colanic acid, and a method for mass-producing colanic acid using same. The ingredients and concentrations in the culture medium of the present invention were optimized using a statistical method, and thus the culture medium can be used to significantly increase the produced amount of colanic acid.

(57) 요약서: 본 발명은 콜라닉 산을 대량 생산하기 위한 균주 배양 배지 조성물 및 이를 이용하여 콜라닉 산을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 배양 배지의 성분 및 농도는 통계적인 방법을 이용하여 최적화된 것으로 이를 사용하여 콜라닉 산의 생산량을 크게 증가시킬 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/218876 A1

(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))

명세서

발명의 명칭: 돌연변이 대장균을 이용한 콜라닉 산 생산 기술분야

- [1] 본 발명은 돌연변이 대장균을 이용한 콜라닉산 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 콜라닉 산은 음전하를 띄며 분자량이 3.4 kDa인 세포 외 다당류 중의 하나로, 장내세균과에 속하는 여러 세균들이 바이오필름(biofilm)을 형성하고 생장하면서 생산하는 것으로 알려져 있다. 콜라닉 산은 바이오필름의 3차원적 구조 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되며, 그 안에 있는 균들에게 파지 감염에 대한 저항성이나 삼투압, 탈수, 저온, 산화스트레스 같은 환경적 요인에 대한 저항성, 항생제에 대한 저항성 등을 부여한다. 콜라닉 산의 구조는 6개의 당이 반복하여 존재하는 구조를 이루고 있으며, 6개의 당은 각각 푸코스 2개, 갈락토오스 2개, 글루코스 1개, 글루쿠론 산 1개이다. 추가적으로는 여기에 아세트산과 피루빈산을 잔기로 가진다. 이러한 단량체 당들 중 하나인 푸코스는 회귀 당으로, 손쉽게 얻을 수 없지만 여러 생리활성 기능을 가지고 있어서 식의약 및 화장품 분야에 널리 쓰이고 있다. 식품소재로는 높은 수분 결합력으로 인해 응고제, 필름 형성제, 겔 형성제, 유화 안정제로 쓰이며 낮은 칼로리를 가지고 있어 다이어트 당으로도 사용되고 있다. 의약용으로는 항염증제, 항암제 및 면역 증진제 등으로 사용되고 있으며 미백효과, 보습효과, 피부 세포 재생 촉진, 노화방지 등의 효과로 인해 화장품류의 소재로도 사용되고 있다. 하지만 이러한 많은 용도에 비해 얻는 방법이 까다롭고 수율도 낮아 가격이 매우 높은 실정이다. 하지만 여기서 최대생산을 목표로 하는 콜라닉 산은 단량체로 푸코스를 가지고 있고 그 양도 전체 질량의 약 1/3을 차지하고 있어 만약 콜라닉 산을 대량생산하게 된다면 이를 푸코스 생산에 이용할 수 있을 것이다. 또한 최근 연구결과에 따르면 콜라닉 산 자체의 다양한 생리활성기능이 밝혀지고 있어 콜라닉 산의 이용가치가 증대되고 있는 실정이다.
- [3] 그러나 미생물을 이용한 콜라닉 산의 대량생산을 위한 배지 최적화에 대한 연구는 전무한 상태이다. 실제로 다른 종류의 세포 외 다당류 생산 연구들을 살펴보면 배지 성분의 변화에 따라 세포 외 다당류의 생산량이 크게 변한다는 사실을 참고한다면, 배지 최적화에 대한 연구가 필수불가결함을 알 수 있다.
- [4] [선행기술문헌]
- [5] [비특허문헌]
- [6] Front. Microbiol. 6:496(2015), Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명자들은 세포막을 이루는 지질다당류의 형성에 관여하는 유전자 중 *waaF* 유전자를 제거하면 불완전한 지질다당류를 형성하고, 그로 인해 해당 세포가 외부 스트레스를 받으면 이에 대한 방어기작으로 콜라닉산을 생산한다는 선행연구를 기초로 하여, 콜라닉 산의 생산에 최적인 균주를 개발하고, 배양 배지 최적화를 통해 콜라닉 산을 대량으로 생산하는 방법을 완성하였다.

[8] 따라서, 본 발명의 목적은 *waaF* 유전자가 제거된 돌연변이 *E. coli* JM109 균주를 이용하고 배지의 최적화를 통한 콜라닉산 대량 생산방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[9] 본 발명은,

[10] 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하여 돌연변이 대장균 JM109 균주를 제조하는 단계; 및

[11] 상기 제조된 돌연변이 대장균 JM109 균주를 발효 배지에서 배양하는 단계; 를 포함하는 콜라닉산 생산방법을 제공한다.

[12] 공시균주에 해당하는 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하기 위하여 특정 유전자를 제거하기 위한 공지된 유전자 조작 기술이 제한없이 이용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 도 1에 도시된 람다-레드 재조합 기술을 이용하여 *waaF* 유전자가 제거된 돌연변이 대장균 JM109 균주를 제조하였다.

[13] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 발효 배지 조성 및 농도의 최적화를 위하여 다양한 탄소원 및 질소원에 대한 균주의 콜라닉산 생산 수율을 확인하여 탄소원으로 글루코스를 사용하고 질소원으로 트립톤을 사용하는 경우 콜라닉산 생산률이 우수함을 확인하였다.

[14] 이에 따라, 상기 발효 배지는 글루코스, 트립톤 및 인산나트륨(Na_2HPO_4)을 포함할 수 있고, 염화나트륨(NaCl), 황산마그네슘(MgSO_4), 염화칼슘(CaCl_2) 및 인산칼륨(KH_2PO_4)을 추가로 더 포함할 수 있다.

[15] 상기 발효 배지는 글루코스 10 내지 30 g/l, 인산나트륨 7 내지 15g/l, 인산칼륨 1 내지 5 g/l, 염화나트륨 0.1 내지 1 g/l, 트립톤 1 내지 5 g/l, 황산마그네슘 0.1 내지 0.5 g/l 및 염화칼슘 0.005 내지 0.02 g/l 를 포함할 수 있다.

[16] 본 발명자들은 균주 발효 배지의 최적화를 위해 부분 배치 설계 (fractional factorial design), 최급상승법 (steepest ascent method), 반응표면분석 (response surface methodology)과 같은 통계적 방법을 이용하여, 배지 혼합물에 들어가는 다양한 성분 중에서 콜라식 산 생산량에 가장 큰 영향을 끼치는 변수들을 선정하고 방대한 실험 조건의 수를 최소화하여 간편하고 효율적으로 배지의 최적조건을 선정하였다.

[17] 이에 따라, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 최적화된 발효 배지는 글루코스 20

g/l, 인산나트륨 10.62 g/l, 인산칼륨 3.00 g/l, 염화나트륨 0.5 g/l, 트립톤 2.63 g/l, 황산마그네슘 0.24 g/l 및 염화칼슘 0.011 g/l 를 포함할 수 있다.

[18] 상기 발효 배지에서 돌연변이 대장균 균주의 배양은 20 내지 30°C에서 수행될 수 있고, 구체적으로는 25°C에서 수행될 수 있다.

[19] 돌연변이 대장균 균주를 발효 배지에서 배양하기 전에 LB 배지에서 전 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[20] 상기 LB 배지는 아가(agar)를 포함하며, 상기 전 배양 단계는 30 내지 40°C에서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[21] 본 발명의 콜라닉 산 생산방법은 콜라닉 산 생산에 적합하도록 균주 및 배양 배지를 최적화한 것으로, 최적화 전보다 콜라닉 산의 생산이 현저히 증가하였다.

도면의 간단한 설명

[22] 도 1은 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하기 위한 감마-레드 매개 재조합 방법(λ -red mediated recombination method)을 간단히 도시한 것이다.

[23] 도 2는 *waaF* 유전자가 결실된 대장균 JM109 균주를 배양하는 배지에 존재하는 탄소원의 종류 및 농도에 따른 (A) 콜라닉 산 생산 및 (B) 세포 성장률의 차이를 비교한 것이다.

[24] 도 3은 *waaF* 유전자가 결실된 대장균 JM109 균주를 배양하는 배지에 존재하는 탄소원인 글루코스의 농도에 따른 (A) 콜라닉 산 생산 및 (B) 세포 성장률의 차이를 비교한 것이다.

[25] 도 4는 *waaF* 유전자가 결실된 대장균 JM109 균주를 배양하는 배지에 존재하는 질소원의 종류 및 농도에 따른 (A) 콜라닉 산 생산 및 (B) 세포 성장률의 차이를 비교한 것이다.

[26] 도 5는 중심합성계획법 기반 트립톤 및 제 2인산 나트륨 농도에 따른 콜라닉산 생산량의 3차원 반응표면도를 나타낸 것이다.

[27] 도 6은 최적 배지 조건(20.00 g/l 글루코스, 2.63 g/l 트립톤, 10.62 g/l Na_2HPO_4 , 3.00 g/l KH_2PO_4 , 0.50 g/l NaCl, 0.24 g/l MgSO_4 , 및 0.011 g/l CaCl_2) *waaF* 유전자가 결실된 대장균 JM109 균주 배양한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

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

[29]

[30] [실시예 1] 유전자 제거

[31] 본 발명에 이용한 균주는 *E. coli* JM109 $\Delta waaF$ 로, 일반적인 *E. coli* JM109 균주에서 *waaF* 유전자가 제거되었다. 유전자 제거를 위하여 사용한 전략은 λ -red 재조합 기술로, 도 1에 간략하게 소개되어있으며, 상세 과정은 다음과 같다.

[32] 1) pKD4 플라스미드를 이용하여 플립카아제 인식대상(FRT) 사이에 있는

카나마이신 저항 유전자, 및 *waaF*의 플랭킹 부위(flanking regions)와 상동성을 가지는 업스트림(upstream) 및 다운스트림(downstream) 유전자를 포함하는 서열단편을 PCR을 통해 증폭시킨다.

[33] 상기 서열단편의 증폭에 사용된 프라이머 세트는 다음과 같다:

[34] 정방향 프라이머: 5'- ATGGTGCCGTCC

ATTATTATCGCGGATGCCGGAAGTTAACGAAGCTATTCTTGTGTAGGCTGG
AGCTGCTTC-3'(서열번호 1) 및 역방향 프라이머 5'-

GATAACCCTCCGCAGCGTCACC TTTACGCACTTTGTGATAGCCGGTAATC

ATGGGAATTAGCCATGGTCC-3'(서열번호 2). 상기 프라이머의 밀출친 서열 부위는 *waaF*의 상동 재조합 부위를 나타낸다.

[35] 2) *E. coli* JM109에 pKD46 플라스미드를 삽입한다.

[36] 3) pKD46 플라스미드가 삽입된 *E. coli* JM109에 1)과정에서 증폭된 선형 DNA 템플릿을 삽입시킨 후 pKD46 플라스미드를 발현시킨다.

[37] 4) 플립파아제 재조합 단백질을 발현하는 pCP20 플라스미드를 삽입한 후 발현시켜 기존 *E. coli* JM109에서 *waaF* 유전자만 제거된 균주를 완성하였다.

[38]

[39] **[실시예 2] 발효 조건**

[40] 배지 최적화에 이용할 기본 배지로는 각 성분들의 영향을 쉽게 볼 수 있고, 분석에 최소한의 영향을 주는 배지인 M9 최소배지로 결정하였고, 상기 최소배지의 조성을 일부 변경하고 배지 성분의 농도범위를 다양하게 변경하여 사용하였다. 구체적으로 최적화 전 M9 최소 배지 조성은 10.00-30.00 g/l 글루코스(glucose), 1.00-2.00 g/l 트립톤(tryptone), 3.00-10.00 g/l 인산나트륨(Na_2HPO_4), 1.50-4.50 g/l 인산칼륨(KH_2PO_4), 0.12-0.36 g/l 황산마그네슘 (MgSO_4), 0.005-0.017 g/l 염화칼슘(CaCl_2), 및 0.50 g/l 염화나트륨(NaCl)을 사용하였다. 조사결과 온도가 낮을 때 콜라닉 산이 많이 생산된다는 결과가 나왔으므로, 발효는 25°C로 진행하였다. 그 밖에 세부조건은 250 ml 삼각플라스크에 50 ml 로 진행하였고, 200 rpm으로 배양을 진행한 후 24시간 후의 균 생장정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하였다.

[41]

[42] **[실시예 3] 콜라닉 산의 정량**

[43] 콜라닉 산의 정량은 단량체 중 하나인 글루쿠론 산을 특정하게 정량하는 방식으로 진행하였다. 배양한 배지를 회수한 후 90-95°C 에 10분간 반응시켜 단백질을 불활성화시켰다. 그 후 4°C, 10,000 X g, 30분간의 원심분리하여 균은 침전물 형태로, 콜라닉 산은 상등액에 존재하도록 분리하였다. 상등액만을 회수한 후 상등액 부피의 3배에 해당하는 부피의 에탄올을 첨가하여 콜라닉산을 침전시켰다. 또 다시 4°C, 10,000 X g, 30분간의 원심분리를 통해 침전물을 회수한 후 증류수에 녹여서 글루쿠론 산 정량에 이용하였다. 글루쿠론 산 정량은 구체적으로 다음과 같이 수행하였다:

- [44] 1) 1 ml의 샘플에 12.5 mM 농도의 sodium tetraborate-sulfuric acid 용액 5 ml을 첨가한 후 100°C에 5분간 반응시킨다.
- [45] 2) 충분히 식힌 후 0.5% (w/v) 수산화나트륨 수용액에 hydroxydiphenyl을 1.5 g/l로 녹인 용액을 100 μ l 첨가한 후 충분히 섞어준다.
- [46] 3) 용액의 526 nm에서의 흡광도를 측정하여 표준 그래프에 대입하여 해당 샘플의 글루쿠론 산 농도를 계산한다.
- [47] 4) 표준 그래프는 글루쿠론 산 표준용액을 통해 도시한다.

[48]

[49] **[실시예 4] 최적 탄소원 선정**

- [50] M9 최소배지 성분 중 다른 성분들은 그대로 둔 채 탄소원 종류와 농도만 변경하여 균 성장 정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하였다. 탄소원은 글루코스, 수크로스, 글리세롤, 자일로오스, 당밀, 맥아 추출물 총 6가지를 이용하였다. 구체적으로 6.78 g/l Na_2HPO_4 , 3.00 g/l KH_2PO_4 , 0.50 g/l NaCl, 1.00 g/l NH_4Cl , 0.24 g/l MgSO_4 , 및 0.011 g/l CaCl_2 을 포함하는 발효 배지에 5, 10, 15 및 20 g/l의 농도로 상기 탄소원을 추가하여 콜라닉 생산량을 측정하였다.
- [51] 도 2에 나타나 있듯이, 글루코스를 탄소원으로 했을 때 콜라닉 산이 가장 많이 생산되었으며 균 성장 결과도 나쁘지 않은 결과를 보였기에 최적 탄소원으로 글루코스를 선정하였다. 하지만 농도에 따른 차이는 확인하기 어려웠기에 농도별 보강실험을 진행하였다. 도 3을 보면 글루코스의 농도가 20 g/l일 때 콜라닉 산 생산량과 균 성장 정도가 최대를 보였기에 후속 실험에서 탄소원을 글루코스 20 g/l로 진행하였다.

[52]

[53] **[실시예 5] 최적 질소원 선정**

- [54] 탄소원은 앞선 실험에서 알아냈듯이 글루코스 20 g/l로 설정하고 다른 요인들은 그대로 둔 채 질소원의 종류와 농도를 변화시켜가며 균 성장 정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하였다. 질소원은 유기질소로는 펩톤, 트립톤, 효모추출물, 요소, 옥수수 침지액, 무기질소로는 황산암모늄, 염화암모늄 모두 총 7가지를 이용하였다. 구체적으로 20.00 g/l glucose, 6.78 g/l Na_2HPO_4 , 3.00 g/l KH_2PO_4 , 0.50 g/l NaCl, 0.24 g/l MgSO_4 , 및 0.011 g/l CaCl_2 을 포함하는 발효 배지에 0.5, 1, 및 1.5 g/l의 농도로 상기 질소원을 추가하여 콜라닉 생산량을 측정하였다.
- [55] 도 4에 나타나 있듯이, 트립톤이 제공되었을 때 가장 높은 콜라닉 산 생산량을 보였다. 균 성장 측면에서도 효모추출물 다음으로 가장 좋은 결과를 보였다. 따라서 질소원으로는 트립톤을 선정하였으며 농도는 1.5 g/l로 후속 실험을 진행하였다.
- [56] 그 결과, 실시예 4 및 5를 통하여 탄소원 및 질소원을 각각 글루코스 및 트립톤으로 하여 최종 M9 최소배지 조성은 글루코스, 인산나트륨, 인산칼륨, 염화나트륨, 트립톤, 황산마그네슘 및 염화칼슘으로 결정하였다.

[57]

[58] [실시예 6] 콜라닉 산 합성의 배양 배지 최적화를 위한 통계적 방법.

[59] <6-1> 부분요인배치법(Fractional factorial design, FFD)

[60] 해당 실험은 본격적으로 배지 성분들의 농도를 최적화 하기 위한 첫 번째 단계로, 부분요인배치법은 각 성분이 콜라닉 산 생산량에 얼마나 큰 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험이다.

[61] 콜라닉산 생산에 영향을 미치는 배양 배지에서 가장 중요한 성분을 스크리닝하기 위해, Minitab 18.1 (Minitab, State College, PA, USA)을 사용하여 FFD를 만들었다. FFD는 3 개의 레벨 (-1, 0 및 1) (표 1)을 갖는 6 개의 독립 변수로 구성되어 18 개의 실험 혼합물을 만들었다 (표 2). FFD에서는 포도당 (X1), 트립톤 (X2), Na₂HPO₄ (X3), KH₂PO₄ (X4), MgSO₄ (X5) 및 CaCl₂ (X6)의 양 (g/l)을 독립 변수로 취하였으며, 대장균 JM109 $\Delta waaF$ (Y1) 및 세포 밀도 (OD600; Y2)에 의해 생성된 콜라닉 산의 양 (mg/l)을 종속 변수로 하였다. 종속 변수의 코딩된 값은 다음 공식에 따라 얻어졌다:

[62]

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

[63] 여기서, x_i 는 배지 성분의 레벨 (코딩된 값)이고, X_i 는 레벨 x_i 에서의 배지 성분의 실제 값이고, X_0 는 기준점에서의 배지 성분의 실제 값이고, ΔX_i 는 단계 변화 값이다. 모든 실험은 3 번 수행되었다.[64] FFD의 실험 결과를 토대로 콜라닉 산 생산에 중요한 영향을 미치는 구성 요소를 식별하기 위해 회귀 분석을 수행하였다. 간단히 말해, X_i 가 계수 계산치(Coefficient estimate)의 절대 값이 높으면 X_i 가 콜라닉 산 생성에 중요한 영향을 미친다는 것을 의미한다. X_i 가 계수 계산치(Coefficient estimate)가 음수이면 X_i 가 콜라닉 산 생산에 부정적인 영향을 미친다는 것을 의미하고 양수이면 긍정적인 영향을 끼친다.

[65] 실험 농도의 설정은 M9 최소배지와 앞선 실험들은 기준으로 설정하였으며, 표 1에 정리하였다. 설정된 농도로 부분요인배치를 설계하였고, 설계에 따라 실험을 한 후 균 생장 정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하여 표 2에 정리하였다. 정확한 결과를 도출하기 위해 회귀분석을 실행하였고, 회귀분석 결과는 표 3에 나와있다. 회귀분석 결과 X2와 X3, 즉 트립톤과 제 2인산 나트륨이 콜라닉 산 생산량에 큰 영향을 끼친다는 것을 확인하였으며, 설정된 농도범위에서는 농도가 높을수록 콜라닉 산 생산량이 증가한다는 것을 알아내었다. 따라서 다음 실험으로는 이 두 성분의 농도를 최적화하는 실험을 진행하였다.

[66]

[67]

[표 1]

부분요인배치법 농도범위 설정

Independent variable (g/l)	Variable	Level ^a		
		-1	0	+1
X_1	Glucose	10	20	30
X_2	Tryptone	1.0	1.5	2.0
X_3	Na ₂ HPO ₄	3.78	6.78	9.78
X_4	KH ₂ PO ₄	1.5	3.0	4.5
X_5	MgSO ₄	0.12	0.24	0.36
X_6	CaCl ₂	0.005	0.011	0.017

$$^a x_1 = (X_1 - 20)/10; x_2 = (X_2 - 1.5)/0.5; x_3 = (X_3 - 6.78)/3; x_4 = (X_4 - 3)/1.5;$$

$$x_5 = (X_5 - 0.24)/0.12; x_6 = (X_6 - 0.011)/0.006$$

[68]

[표2]

부분요인배치법 실험설계, 결과

Run	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	x ₅	x ₆	Y ₁ (CA; mg/l) ^a	Y ₂ (OD ₆₀₀) ^a
1	-1	1	1	-1	-1	-1	1289.8 ± 20.1	2.02 ± 0.05
2	1	1	-1	-1	-1	1	822.1 ± 71.6	1.58 ± 0.05
3	-1	1	-1	-1	1	1	752.4 ± 30.4	1.79 ± 0.04
4	1	1	-1	1	-1	-1	817.3 ± 17.9	1.66 ± 0.08
5	0	0	0	0	0	0	1201.7 ± 72.8	1.71 ± 0.06
6	-1	-1	1	-1	1	1	1075.3 ± 33.9	1.18 ± 0.03
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	671.5 ± 51.6	1.22 ± 0.01
8	1	-1	-1	-1	1	-1	690.6 ± 20.7	1.07 ± 0.09
9	-1	1	1	1	-1	1	1287.0 ± 13.1	2.43 ± 0.03
10	-1	-1	-1	1	-1	1	224.0 ± 11.7	1.48 ± 0.02
11	1	1	1	1	1	1	1447.3 ± 88.8	2.33 ± 0.09
12	1	-1	1	-1	-1	1	1075.3 ± 24.4	1.24 ± 0.07
13	1	-1	1	1	-1	-1	849.1 ± 15.8	1.27 ± 0.01
14	1	1	1	-1	1	-1	1210.6 ± 45.7	2.09 ± 0.08
15	1	-1	-1	1	1	1	676.3 ± 32.3	1.31 ± 0.05
16	0	0	0	0	0	0	1356.3 ± 49.8	1.66 ± 0.01
17	-1	-1	1	1	1	-1	770.8 ± 18.8	1.41 ± 0.08
18	-1	1	-1	1	1	-1	954.8 ± 73.6	1.76 ± 0.08

^aData were expressed as means ± standard deviations of triplicate experiments

[69]

[표3]

부분요인배치법 결과 회귀분석

Source	Coefficient estimate	Mean square	F-value	p-value ^a
Model		117087	13.09	0.028
Intercept	913.4			0.000
X_1	35.2	19814	2.22	0.233
X_2	159.3	405992	45.40	0.007
X_3	212.3	720865	80.62	0.003
X_4	-35.1	19679	2.20	0.235
X_5	33.9	18363	2.05	0.247
$X_1 \times X_2$	-33.5	17977	2.01	0.251
$X_1 \times X_4$	34.0	18493	2.07	0.246
$X_1 \times X_6$	50.1	40168	4.49	0.124
$X_2 \times X_4$	89.0	126744	14.17	0.033
Curvature		237603	26.57	0.014
Residual		8942		
Lack of fit		7435	0.62	0.668
Pure error		11956		

^aThe results with *P*-values higher than 0.3 are not shown.* $R^2=0.9839$

[70] [실시예 7] 최적상승법

[71] 부분요인배치법에서 선별된 두 성분의 최적농도를 알기 위해 우선 대략의 최적농도를 알아낼 수 있는 최적상승법을 진행하였다. 설정된 농도범위에서는 두 성분 모두 농도가 높아질수록 콜라닉 산의 생산량이 증가하므로 두 성분의 농도를 같이 높여가며 균 생장 정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하여 두 성분의 대략적인 최적농도범위를 알아내었다. 표 4를 보면 예상대로 두 성분의 농도가 높아질수록 콜라닉 산의 생산량이 증가하다가 8번 실험에서 최댓값을 나타내었다. 따라서 트립톤은 2.90 g/l, 제 2인산 나트륨은 10.98 g/l 부근에서 최적조건이 있음을 확인하였다.

[72]

[73]

[표4]

최 급상승법 실험설계, 결 과

Run	X_2	X_3	CA (mg/l)	OD ₆₀₀
1	1.50	6.78	1224.9 ± 11.4	1.52 ± 0.06
2	1.70	7.38	1326.7 ± 78.3	1.70 ± 0.01
3	1.90	7.98	1391.3 ± 179.4	1.85 ± 0.04
4	2.10	8.58	1593.3 ± 107.0	2.08 ± 0.08
5	2.30	9.18	1581.3 ± 69.9	2.23 ± 0.08
6	2.50	9.78	1691.0 ± 82.2	2.34 ± 0.07
7	2.70	10.38	1830.0 ± 65.6	2.49 ± 0.06
8	2.90	10.98	1887.4 ± 110.4	2.67 ± 0.10
9	3.10	11.58	1701.4 ± 53.7	2.78 ± 0.04

- [74] [실시예 8] 중심합성계획법(central composite design, CCD)을 통한 표면반응법
- [75] 최 급상승법에서 나온 결과를 바탕으로 트립톤 및 Na₂HPO₄의 농도 대략의 최적조건을 전후로 하여 중심합성계획법을 실시하였다.
- [76] 구체적으로, 최대 콜라닉 산 생성을 위한 2 가지 배양 배지 성분 (즉, 트립톤 및 Na₂HPO₄)의 최적 농도를 결정하기 위해, CCD는 5 개의 코드 값(-1.414, -1, 0, 1 및 1.414)으로 수행되었다. 두 가지 인자 (트립톤 및 Na₂HPO₄)의 코드 값은 다음 공식을 사용하여 계산되었다:

$$[77] \quad x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (1)$$

- [78] 회귀 분석에 기초하여 트립톤 및 Na₂HPO₄의 최적 농도를 시뮬레이션하기 위해 3차 모델을 선택하였다. 3차 모델의 공식은 다음과 같다:

$$[79] \quad y = b_0 + \sum b_1 x_i + \sum b_2 x_j + \sum b_3 x_i x_j + \sum b_4 x_i^2 + \sum b_5 x_j^2 + \sum b_6 x_i^2 x_j + \sum b_7 x_i x_j^2 \quad (2),$$

- [80] 여기서 x_i 및 x_j 는 독립 변수의 코드 값이고 y 는 예측된 응답(콜라닉 산 생성량)이다. 반응 (y)에 영향을 나타내는 다양한 회귀 계수 $b_0, b_1, b_2, b_3, b_4, b_5$ 및 b_6 은 절편 (b_0), 선형 (b_1, b_2), 2 요소 상호 작용 (b_3), 2 차 (b_4, b_5) 및 3차 (b_6, b_7)를 나타낸다. 콜라닉 산 생산에 대한 3차 모델의 각 계수는 회귀 분석을 수행하여 얻었다. 고정된 모델을 바탕으로 Design-Expert 7.0 (Stat-Ease,

Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 콜라닉 산 생산을 위한 트립톤 및 Na_2HPO_4 의 최적 농도를 찾기 위해 반응 표면 플롯을 만들었다.

[81] 결과는 표 5와 같이 나왔으며, 회귀분석 결과는 표 6에 나타내었다. 이를 바탕으로 트립톤과 Na_2HPO_4 의 농도에 따른 콜라닉 산 생산량을 3차원 표면도로 표현하였다(도 5). 그 후 콜라닉 산의 최대생산량을 이끌어내는 점을 찾아서 확인실험을 진행하였다.

[82]

[83] [표5]

중심합성계획법 실험설계, 결과

Run	Factor ^a		CA (mg/l) ^b	OD ₆₀₀ ^b
	x_2	x_3		
1	-1	-1	1771.3 ± 37.2	2.53 ± 0.01
2	-1	1	1503.6 ± 48.9	2.57 ± 0.03
3	0	-1.414	1649.7 ± 47.1	2.75 ± 0.01
4	0	0	1837.3 ± 65.0	2.63 ± 0.08
5	0	0	1704.2 ± 79.0	2.76 ± 0.02
6	0	0	1751.4 ± 96.0	2.72 ± 0.06
7	-1.414	0	1873.4 ± 112.0	2.56 ± 0.11
8	1	-1	1651.3 ± 221.6	2.33 ± 0.08
9	1.414	0	1639.5 ± 61.7	2.69 ± 0.09
10	0	0	1808.7 ± 110.8	2.71 ± 0.02
11	0	0	1840.2 ± 171.0	2.68 ± 0.13
12	1	1	1774.5 ± 101.0	2.62 ± 0.10
13	0	1.414	1788.6 ± 188.9	2.72 ± 0.01

$$^a x_2 = (X_2 - 2.9)/0.2; x_3 = (X_3 - 10.98)/0.6$$

^bData were expressed as means ± standard deviations of triplicate experiments.

[84]

[표6]

중심합성계획법 결과 회귀분석

Source	Coefficient estimate	Mean square	F-value	p-value
Model		15961.07	4.71	0.054
Intercept	1795.22			
X_2	-82.68	27345.92	8.06	0.036
X_3	49.10	9644.83	2.84	0.153
$X_2 \times X_3$	97.72	38198.51	11.26	0.020
X_2^2	-35.06	8551.89	2.52	0.173
X_3^2	-53.68	20042.24	5.91	0.059
$X_2^2 \times X_3$	-85.26	14537.75	4.29	0.093
$X_2 \times X_3^2$	120.42	29000.23	8.55	0.033
Residual		3391.46		
Lack of fit		7848.15	3.45	0.137
Pure error		2277.28		

* $R^2=0.8682$

[85] [실시예 8] 최적배지 확인

[86] 최적조건으로 나온 20.00 g/l 글루코스, 2.63 g/l 트립톤, 10.62 g/l Na_2HPO_4 , 3.00 g/l KH_2PO_4 , 0.50 g/l NaCl, 0.24 g/l MgSO_4 , 및 0.011 g/l CaCl_2 을 포함하는 발효 배지에서 25°C에서 200 rpm으로 배양한 결과 최대 콜라닉 생산량이 2052.8 mg/l로 확인되었다(도 6). 이는 M9 배지를 최적화하기 전보다 그 생산량이 10배 가량 증가한 수치임을 확인하였다.

[87]

청구범위

- [청구항 1] 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하여 돌연변이 대장균 JM109 균주를 제조하는 단계; 및
상기 제조된 돌연변이 대장균 JM109 균주를 발효 배지에서 배양하는 단계;
를 포함하는, 콜라닉 산 생산방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 발효 배지는 글루코스(glucose), 트립톤(tryptone) 및 인산나트륨(Na_2HPO_4)을 포함하는 것인, 콜라닉 산 생산방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 발효 배지는 염화나트륨(NaCl), 황산마그네슘(MgSO_4), 염화칼슘(CaCl_2) 및 인산칼륨(KH_2PO_4)을 더 포함하는 것인, 콜라닉 산 생산방법.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 발효 배지는 글루코스 10 내지 30 g/l, 인산나트륨 7 내지 15g/l, 인산칼륨 1 내지 5 g/l, 염화나트륨 0.1 내지 1 g/l, 트립톤 1 내지 5 g/l, 황산마그네슘 0.1 내지 0.5 g/l 및 염화칼슘 0.005 내지 0.02 g/l 를 포함하는 것인, 콜라닉 산 생산방법.

[도 1]

STEP 1. PCR amplify FRT-flanked resistance gene from template plasmid(pKD4_kanamycin resistance)



STEP 2. Transform linear DNA_pKD4 template to pKD46-harboring *E. coli* JM109



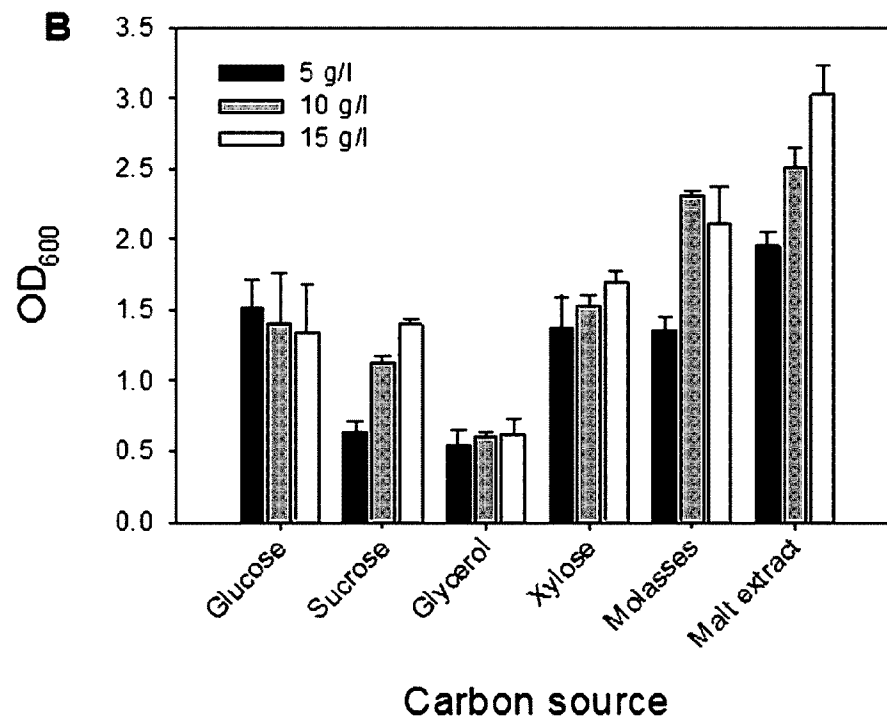
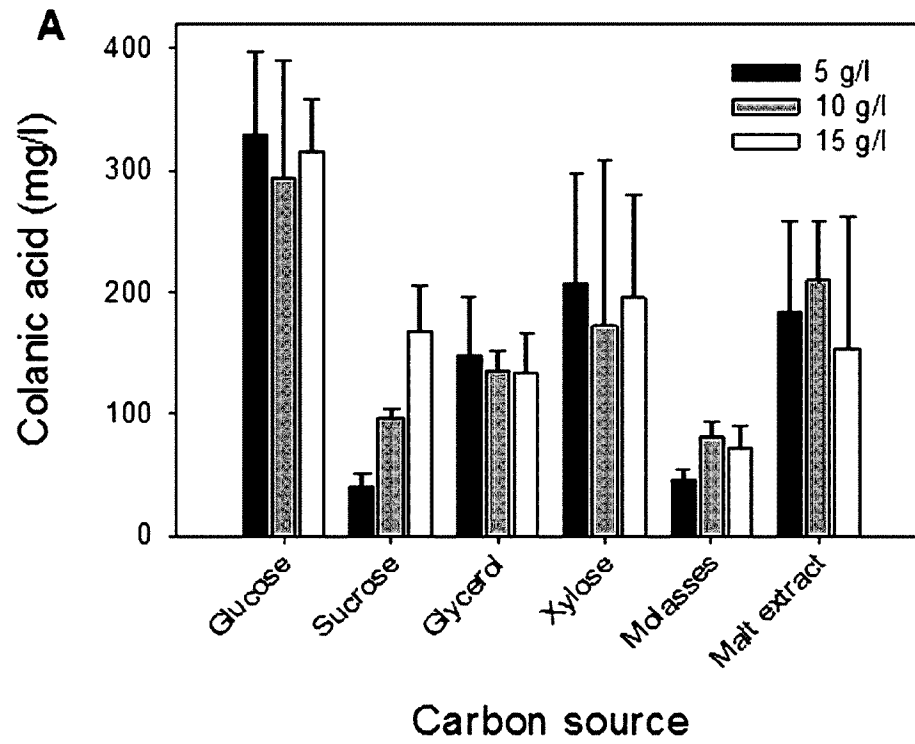
STEP 3. Select kanamycin-resistant transformants



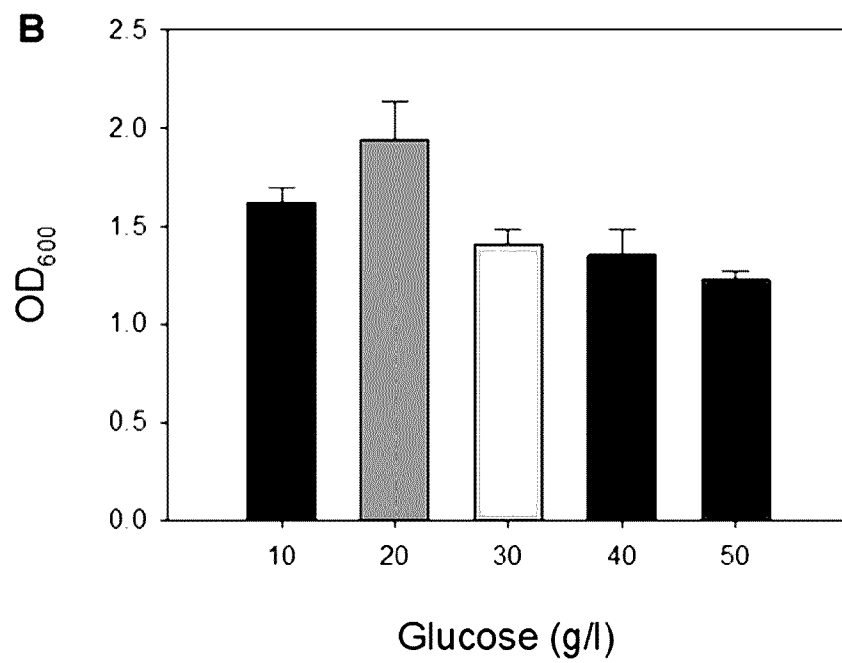
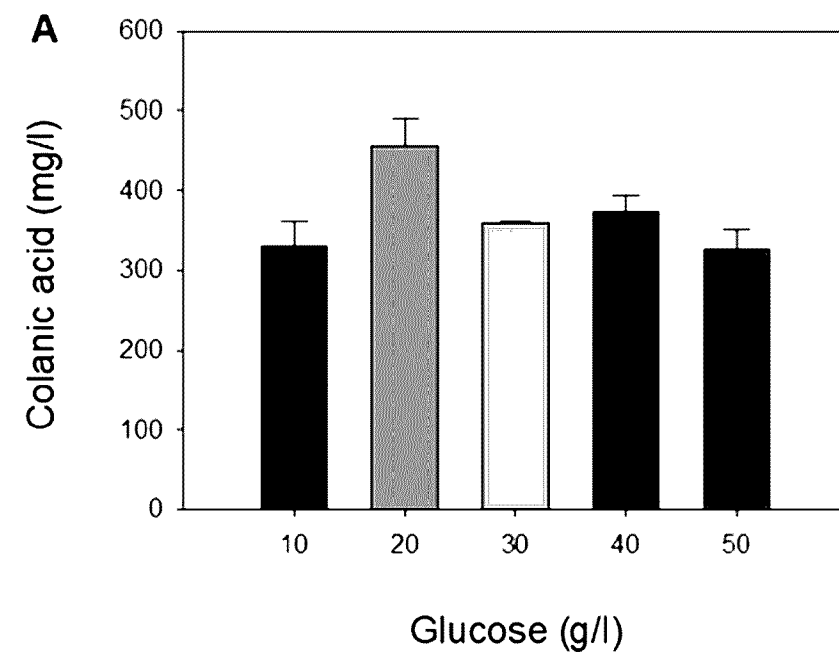
STEP 4. Eliminate kanamycin-resistance cassette by using a FLP expressing plasmid pCP20



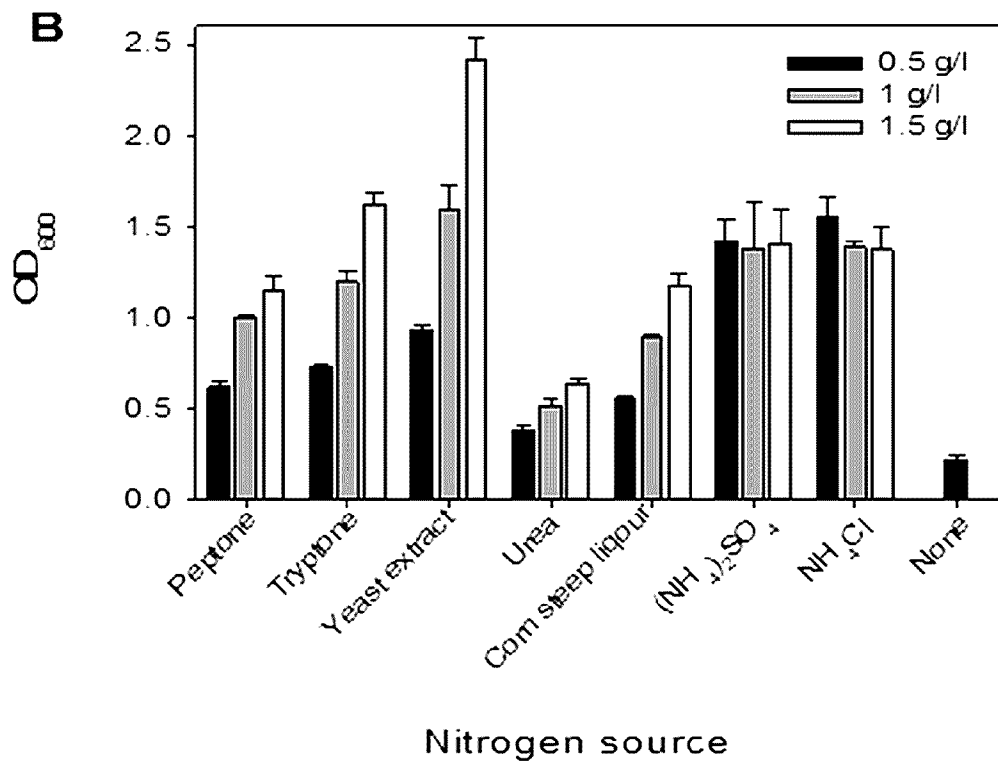
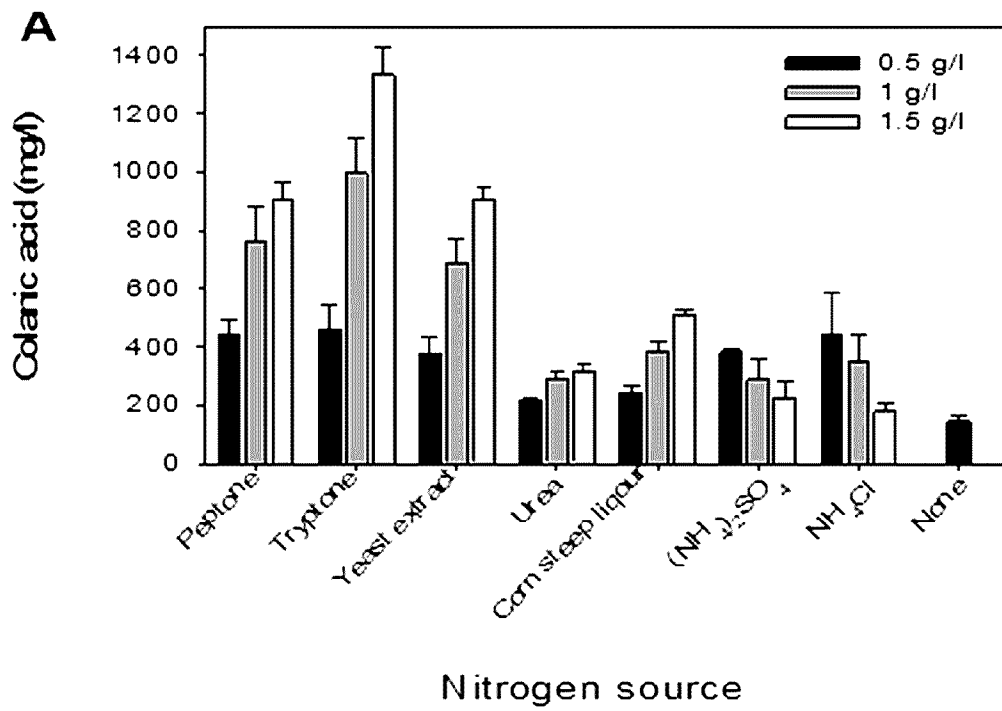
[도2]



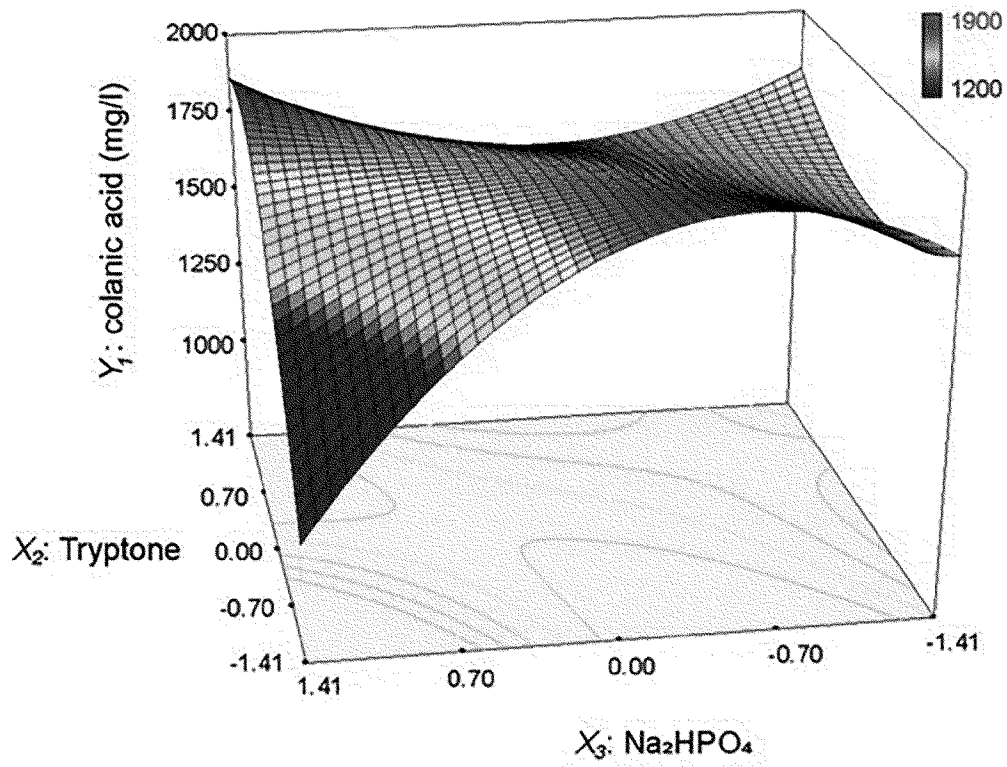
[도3]



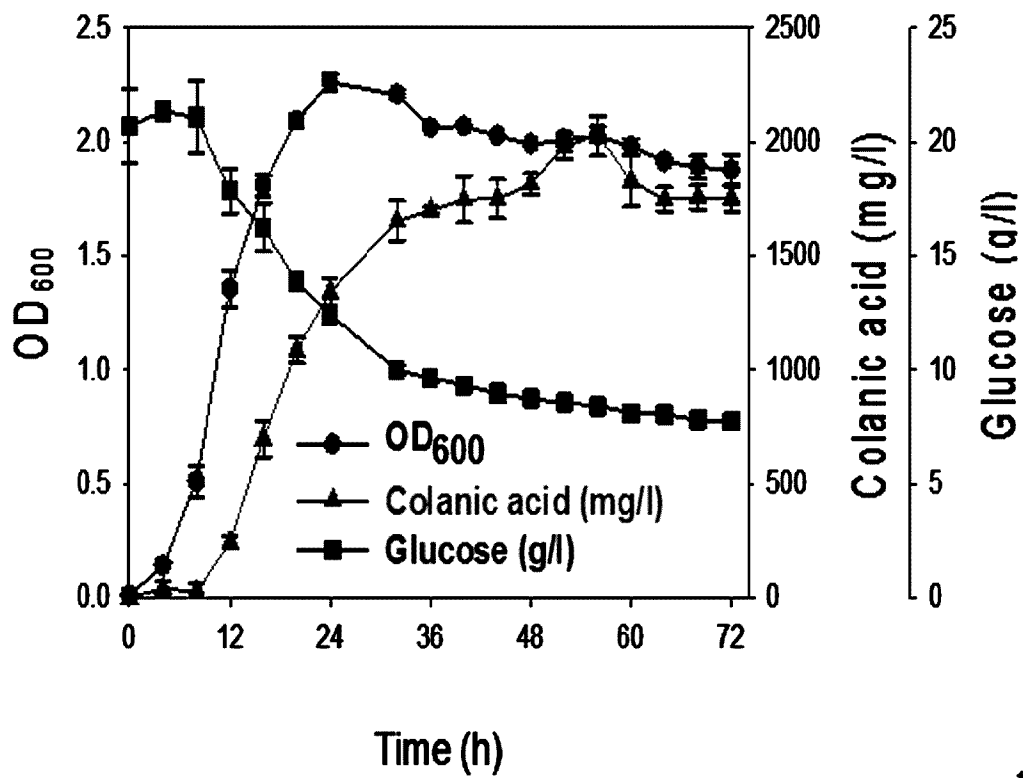
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/005439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/04(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, C12N 9/10(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 19/04; C07K 14/245; C12N 1/21; C12N 15/70; C12P 19/12; C12N 1/20; C12N 9/10

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: mutant, Escherichia coli, colanic acid, waaF, JM109

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REN, G. et al. Effects of Lipopolysaccharide Core Sugar Deficiency on Colanic Acid Biosynthesis in Escherichia coli. Journal of Bacteriology, June 2016, vol. 198, no. 11, pages 1576-1584 See abstract; and pages 1578, 1579.	1-4
Y	ZHAO, A. et al. Metabolic engineering of Escherichia coli to produce gamma-aminobutyric acid using xylose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017, vol. 101, pages 3587-3603 See abstract; and pages 3587-3590.	1-4
A	CN 104845926 B (NANJING TECH UNIVERSITY) 22 December 2017 See the entire document.	1-4
A	US 2018-0216147 A1 (INBIOSE N.V.) 02 August 2018 See the entire document.	1-4
A	WO 2011-083059 A1 (UNIVERSITEIT GENT) 14 July 2011 See the entire document.	1-4



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

26 AUGUST 2020 (26.08.2020)

Date of mailing of the international search report

26 AUGUST 2020 (26.08.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, 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/KR2020/005439

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 104845926 B	22/12/2017	CN 104845926 A	19/08/2015
US 2018-0216147 A1	02/08/2018	AU 2012-351501 A1	03/07/2014
		AU 2012-351501 B2	14/06/2018
		CA 2859056 A1	20/06/2013
		CN 103987841 A	13/08/2014
		CN 103987841 B	28/09/2016
		DK 2791367 T3	01/07/2019
		EP 2791367 A1	22/10/2014
		EP 2791367 B1	24/04/2019
		EP 3517631 A1	31/07/2019
		ES 2733307 T3	28/11/2019
		HK 1203208 A1	23/10/2015
		JP 2015-504654 A	16/02/2015
		JP 2017-079767 A	18/05/2017
		JP 2019-150051 A	12/09/2019
		JP 6084985 B2	22/02/2017
		JP 6530365 B2	12/06/2019
		NZ 625199 A	31/07/2015
		US 2014-0349348 A1	27/11/2014
		US 2017-0342452 A1	30/11/2017
		US 9719119 B2	01/08/2017
		US 9951362 B2	24/04/2018
		WO 2013-087884 A1	20/06/2013
WO 2011-083059 A1	14/07/2011	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12P 19/04(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12P 19/04; C07K 14/245; C12N 1/21; C12N 15/70; C12P 19/12; C12N 1/20; C12N 9/10

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: 돌연변이(mutant), 대장균(Escherichia coli), 콜라닉 산(colanic acid), waaF, JM109

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	REN, G. 등, 'Effects of Lipopolysaccharide Core Sugar Deficiency on Colanic Acid Biosynthesis in Escherichia coli', Journal of Bacteriology, 2016.06., 198권, 11호, 페이지 1576-1584 초록; 및 페이지 1578, 1579	1-4
Y	ZHAO, A. 등, 'Metabolic engineering of Escherichia coli to produce gamma-aminobutyric acid using xylose', Appl. Microbiol. Biotechnol., 2017, 101권, 페이지 3587-3603 초록; 및 페이지 3587-3590	1-4
A	CN 104845926 B (NANJING TECH UNIVERSITY) 2017.12.22 전체 문헌	1-4
A	US 2018-0216147 A1 (INBIOSE N.V.) 2018.08.02 전체 문헌	1-4
A	WO 2011-083059 A1 (UNIVERSITEIT GENT) 2011.07.14 전체 문헌	1-4

☐ 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 이후 “X”에 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

2020년 08월 26일 (26.08.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 08월 26일 (26.08.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

정다원

전화번호 +82-42-481-5373



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 104845926 B	2017/12/22	CN 104845926 A	2015/08/19
US 2018-0216147 A1	2018/08/02	AU 2012-351501 A1	2014/07/03
		AU 2012-351501 B2	2018/06/14
		CA 2859056 A1	2013/06/20
		CN 103987841 A	2014/08/13
		CN 103987841 B	2016/09/28
		DK 2791367 T3	2019/07/01
		EP 2791367 A1	2014/10/22
		EP 2791367 B1	2019/04/24
		EP 3517631 A1	2019/07/31
		ES 2733307 T3	2019/11/28
		HK 1203208 A1	2015/10/23
		JP 2015-504654 A	2015/02/16
		JP 2017-079767 A	2017/05/18
		JP 2019-150051 A	2019/09/12
		JP 6084985 B2	2017/02/22
		JP 6530365 B2	2019/06/12
		NZ 625199 A	2015/07/31
		US 2014-0349348 A1	2014/11/27
		US 2017-0342452 A1	2017/11/30
		US 9719119 B2	2017/08/01
		US 9951362 B2	2018/04/24
		WO 2013-087884 A1	2013/06/20
WO 2011-083059 A1	2011/07/14	없음	