



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0117410
(43) 공개일자 2022년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0020669
(22) 출원일자 2021년02월16일
심사청구일자 2021년02월16일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김경현
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호
(서초동, 삼풍아파트)
윤은주
서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호(시
흥동, 현대빌라)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

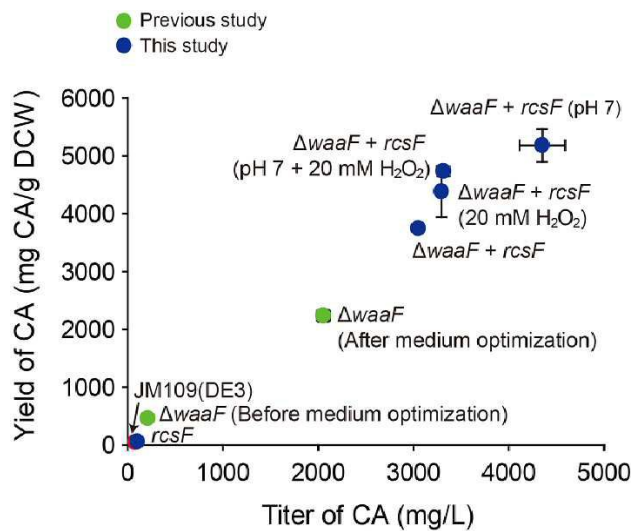
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 재조합 대장균을 이용한 콜라닉 산 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 균주의 유전적 요인 및 균주 배양의 환경적 요인의 변화를 통하여 콜라닉 산을 대량 생산하는 최적의 방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 균주 및 배양 조건을 이용하여 콜라닉 산의 생물학적 생산량을 크게 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

조윤호

서울특별시 용산구 신흥로 77-2(용산동2가)

유소라

서울특별시 성북구 안암로 145, CJ식품안전관 209호(안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111080
과제번호	2020R1A2B5B0200263111
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)중견연구자지원
연구과제명	퓨코스 기반 신규 프리바이오틱스 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하고, *rcsF* 유전자를 도입하여 재조합 대장균 JM109 균주를 제조하는 단계; 및

상기 제조된 재조합 대장균 JM109 균주를 발효 배지에서 배양하는 단계;를 포함하는, 콜라닉 산 생산방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 재조합 대장균 JM109 균주는 pH 7 조건의 발효 배지에서 배양되는 것인, 콜라닉산 생산방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 배양 단계는 산화제를 가하여 산화 스트레스를 생성시키는 단계를 포함하는, 콜라닉 산 생산방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 산화제는 과산화수소(H_2O_2), 초과산화 이온(superoxide ion, O_2^-), 수산화 라디칼(hydroxyl radical, $OH^\cdot$), 차염소산(hypochlorous acid, $HOCl$) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 콜라닉 산 생산방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 배양하는 단계는 인큐베이터에서 수행되며, 배양 볼륨(working volume)은 인큐베이터 전체 용량의 10~50%인 것인, 콜라닉 산 생산방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 발효 배지는 글루코스(glucose), 트립톤(tryptone) 및 인산나트륨(Na_2HPO_4)을 포함하는 것인, 콜라닉 산 생산방법.

청구항 7

제 6항에 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 8

제 7항에 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.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 재조합 대장균을 이용한 콜라닉산 대량 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콜라닉 산은 음전하를 띄며 분자량이 3.4 kDa인 세포 외 다당류 중의 하나로, 장내세균과에 속하는 여러 세균들이 바이오필름(biofilm)을 형성하고 성장하면서 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 퓨코스 2개, 갈락토오스 2개, 글루코스 1개, 글루쿠론 산 1개이다. 추가적으로는 여기에 아세트산과 피루브산을 잔기로 가진다. 이러한 단량체 당들 중 하나인 퓨코스는 희귀 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 퓨코스를 가지고 있고 그 양도 전체 질량의 약 1/3을 차지하고 있어 만약 콜라닉 산을 대량생산하게 된다면 이를 퓨코스 생산에 이용할 수 있을 것이다. 또한 최근 연구결과에 따르면 콜라닉 산 자체의 다양한 생리활성기능이 밝혀지고 있어 콜라닉 산의 이용가치가 증대되고 있는 실정이다.

[0003] 그러나 미생물을 이용한 콜라닉 산의 대량생산을 위한 균주 및 배지 최적화에 대한 연구는 많지 않은 상태이다. 이에 본 발명자들은 이전 연구에서 대장균에 *waaF* 유전자를 제거하고 배양배지 조건을 최적화하여 배양한 결과 콜라닉산의 생산이 향상됨을 확인하였다 (대한민국특허 출원 10-2019-0049226). 이를 통하여, 대장균이 생산하는 콜라닉 산의 농도 및 수율의 향상에 유전적 및 환경적인 조건이 매우 중요함을 확인하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Front. Microbiol. 6:496(2015), Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 대장균으로부터 콜라닉 산의 생산 수율을 향상시키기 위하여 콜라닉 산의 생산에 최적인 균주를 개발하고, 산화 스트레스, 삼투 스트레스와 pH 조건을 포함하는 다양한 환경적인 요인 변화를 통해 콜라닉 산을 대량으로 생산하고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 현재까지 퓨코스의 생산은 주로 갈조류 내에 있는 퓨코이단으로부터 산 가수분해 및 정제과정을 통해 이루어져 왔다. 하지만 갈조류 내에 있는 퓨코이단의 함량은 3-5% 정도로 매우 낮을 뿐 아니라 퓨코이단 내에 있는 퓨코스는 황산기로 치환되어있어 이를 추가로 제거하는 과정을 거치기 때문에 생산수율이 낮다는 단점이 있다 (Ale MT et al (2013) RSC Adv. 3: 8131-8141). 반면 재조합 대장균의 발효를 통해 생산한 콜라닉산으로부터 퓨코스를 얻는다면 갈조류에 비해 퓨코스 생산수율이 상대적으로 높다는 장점이 있다. 그러므로 본 발명에서는 이전 발명에서 제작한 균주인 *waaF* 유전자가 deletion된 *E. coli* JM109(DE3) 균주에 추가적으로 유전적인 요인인 콜라닉 산 생산 관련 유전자를 도입하고, 환경적 요인에 해당하는 다양한 산화 스트레스, 삼투 스트레스와 pH 조건을 도입하여 재조합 대장균으로부터 콜라닉 산의 생산 여부를 확인하였다. 그 결과, *rcsF* 유전자와 산화 스트레스 및 pH 조건이 콜라닉산 생산에 영향을 미치는 인자인 것으로 확인하였다.

[0007] 이에 본 발명은,

[0008] 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하고, *rcsF* 유전자를 도입하여 유전자 재조합 대장균 JM109 균주를

제조하는 단계; 및

- [0009] 상기 제조된 유전자 재조합 대장균 JM109 균주를 발효 배지에서 배양하는 단계;를 포함하는, 콜라닉 산 생산방법을 제공한다.
- [0010] 공시균주에 해당하는 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하고 *rscF* 유전자를 도입하기 위하여 특정 유전자를 제거하거나 도입하기 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 재조합 대장균 JM109 균주를 제조하였다.
- [0011] 대장균에 추가로 도입된 *rscF*는 외막 단백질인 RcsF를 암호화하는 유전자이다. RcsF는 세포막의 스트레스를 감지하여 신호를 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Majdalani N et al (2005) J Bacteriol. 187(19): 6770-6778). 특히 대장균 세포는 RcsCDB 포스포릴레이 시스템 (RcsCDB phosphorelay system)을 통해 콜라닉 산의 생산을 활성화시키는 것으로 알려져 있다 (Ren G et al (2016) J Bacteriol. 198(11): 1576-1584).
- [0012] 구체적인 일 실시예에서, *waaF* 유전자가 deletion된 대장균에 *rscF* 유전자를 추가로 도입한 경우, 기존에 *waaF* 유전자가 deletion된 대장균이 생산한 콜라닉산의 농도 및 수율보다 각각 약 1.4배 및 1.2배 높음을 확인하였다 (도 2).
- [0013] 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 콜라닉 산 생산량에 가장 큰 영향을 끼치는 변수들을 선정하고 방대한 실험 조건의 수를 최소화하여 간편하고 효율적으로 배지의 최적조건을 선정하였다(대한민국특허 출원 10-2019-0049226).
- [0014] 구체적으로, 발효 배지 조성 및 농도의 최적화를 위하여 다양한 탄소원 및 질소원에 대한 균주의 콜라닉산 생산 수율을 확인하여 탄소원으로 글루코스를 사용하고 질소원으로 트립톤을 사용하는 경우 콜라닉 산 생산 수율이 우수함을 확인하였다. 이에 따라, 상기 발효 배지는 글루코스, 트립톤, 인산나트륨(Na_2HPO_4), 염화나트륨(NaCl), 황산마그네슘(MgSO_4), 염화칼슘(CaCl_2) 및 인산칼륨(KH_2PO_4)을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0015] 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.
- [0016] 본 발명의 구체적인 일 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.
- [0017] 상기 발효 배지에서 재조합 대장균 균주의 배양은 20 내지 30℃에서 수행될 수 있고, 구체적으로는 25℃에서 수행될 수 있다.
- [0018] 재조합 대장균 균주를 발효 배지에서 배양하기 전에 LB 배지에서 전 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 LB 배지는 아가(agar)를 포함하며, 상기 전 배양 단계는 30 내지 40℃에서 수행될 수 있다.
- [0020] 상기 배양하는 단계는 액체 배양 배지를 포함하는 배양기(incubator)에서 수행될 수 있다. 본 발명에서 배양기는 미생물을 배양할 수 있는 각종 플라스크 및 반응기를 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 배양기에서 균주를 배양할 경우, 배양 볼륨(working volume)은 배양기 전체 용량의 10~50%일 수 있으며, 바람직하게는 20~30%일 수 있다.
- [0021] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 상기 *waaF* 유전자를 제거되고 *rscF* 유전자가 도입된 재조합 대장균 JM109 균주는 pH 7 조건의 발효 배지에서 배양될 수 있다. 구체적인 일 실시예에서, pH 7의 중성 조건에서 배양한 결과, 콜라닉산 농도(4351.6 mg/L) 및 수율(5180.4 mg/g DCW)을 얻었다.
- [0022] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 상기 *waaF* 유전자를 제거되고 *rscF* 유전자가 도입된 재조합 대장균 JM109 균주의 배양시 산화 스트레스를 부가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 용어 "산화 스트레스"란, 세포의 주변 환경에 높은 함량의 산화성 물질이 존재하여, 상기 산화성 물질로 인하여 세포의 막에 포함된 지질 등의 성분이 산화될 수 있는 가능성이 증가되는 스트레스를 의미한다. 생

체 내에서는 상기 산화스트레스를 경감시킬 수 있는 항산화물질을 분비하여, 상기 산화 스트레스를 해소할 수 있으나, *in vitro* 조건에서는 항산화 물질을 인위적으로 첨가하여야 한다. 특히, 균주의 배양환경에 산화 스트레스가 부가되면, 균주의 세포막의 지질 성분을 산화시켜서 성장, 증식 등의 다양한 대사를 저해하기 때문에, 상기 배양환경내의 산화 스트레스의 수준이 증가할수록 균주의 성장이 감소하게 되고, 일정 수준 이상인 경우에는 균주는 사멸하게 된다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 산화 스트레스는 균주의 배양환경에 산화제를 부가함에 의하여 형성될 수 있고, 구체적으로 과산화수소(H_2O_2), 초과산화 이온(superoxide ion, O_2^-), 수산화 라디칼(hydroxyl radical, $OH^\cdot$), 차염소산(hypochlorous acid, $HOCl$) 등을 단독으로 또는 혼합하여 사용할 수 있고, 상기 산화제의 부가량 역시 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 0.5 내지 100mM, 보다 바람직하게는 5 내지 50mM, 가장 바람직하게는 10 내지 30mM의 농도로 균주의 배지에 부가할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 콜라닉 산 생산방법은 콜라닉 산 생산에 적합하도록 대장균 균주의 유전적 요인 및 배양 배지의 성분, pH, 및 스트레스 등의 환경적 요인을 최적화한 것으로, 최적화 전과 비교하여 콜라닉 산의 농도 및 수율이 현저히 증가하였다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하기 위한 감마-레드 매개 재조합 방법(λ -red mediated recombination method)을 간단히 도시한 것이다.

도 2는 모균주 및 재조합 대장균에 의해 생산된 콜라닉산의 농도와 수율을 비교한 결과를 나타낸 것이다. (A) 생장 곡선, (B) *E. coli* JM109(DE3), *E. coli* *rscF*, *E. coli* $\Delta waaF$, *E. coli* $\Delta waaF$ +pET21a, *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF* 균주들로부터 얻은 콜라닉산의 농도와 수율.

도 3은 *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF* 균주에 의해 생산되는 콜라닉산의 농도와 수율에 영향을 미치는 염화나트륨의 효과를 나타낸 것이다. (A) 생장 곡선, (B) 염화나트륨의 농도 범위를 0부터 300 mM로 정해 0, 10, 25, 50, 100, 200, 300 mM을 각각 배지에 넣었을 때 *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF* 균주에 의해 얻어지는 콜라닉산 농도와 수율.

도 4는 *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF* 균주가 생산하는 콜라닉산에 과산화수소가 미치는 영향을 도시한 것이다. (A) 생장 곡선, (B) 1부터 50 mM 범위로 과산화수소를 배지에 넣었을 때 *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF* 균주가 생산하는 콜라닉산 농도와 수율 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

도 5는 *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF*이 콜라닉산을 최대 생산하기 위한 배지의 최적 pH를 확인한 결과이다. (A) 생장 곡선, (B) 배지의 pH 범위를 5에서 8까지로 지정했을 때 생산한 *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF* 균이 생산한 콜라닉산 농도와 콜라닉산 수율.

도 6은 *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF*로부터 콜라닉산 최대생산을 위한 최적 pH와 과산화수소 농도를 조합으로 한번에 배지에 가했을 때 재조합 대장균이 생산하는 콜라닉산에 미치는 영향을 비교한 결과이다. (A) 생장 곡선, (B) 배지가 pH 7로 유지되는 조건에 20 mM 과산화수소를 첨가했을 때와 그렇지 않을 때 *E. coli* $\Delta waaF$ +*rscF* 균이 생산하는 콜라닉산 농도와 콜라닉산 수율.

도 7은 대장균의 유전자 변이 및 환경적 변화에 따른 콜라닉산 생산 농도 및 수율 변화를 비교한 결과이다.

도 8은 재조합 대장균을 배양기(incubator)에서 발효시키는 경우, 배양 볼륨 변화에 따른 콜라닉산 생산 수율 변화를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] [실시예 1] 재조합 대장균 제조

[0029] 1. *waaF* 유전자 제거

[0030] 본 발명에 이용한 균주는 *E. coli* JM109 $\Delta waaF$ 로, 일반적인 *E. coli* JM109 균주에서 *waaF* 유전자가 제거되었

다. 유전자 제거를 위하여 사용한 전략은 λ -red 재조합 기술로, 도 1에 간략하게 소개되어있으며, 상세 과정은 다음과 같다.

[0031] 1) pKD4 플라스미드를 이용하여 플립과아제 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.

[0032] 상기 서열단편의 증폭에 사용된 프라이머 세트는 다음과 같다:

[0033] 정방향 프라이머: 5'-ATGGTGCCGTCC ATTATTATCGCGGATGCCGGAAGTTAACGAAGCTATTCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' (서열번호 1) 및 역방향 프라이머 5'-GATAACCCTCCGCAGCGTCACCTTACGCACTTTGTGATAGCCGTAATCATGGGAATTAGCCATGGTCC-3' (서열번호 2). 상기 프라이머의 밑줄친 서열 부위는 *waaF*의 상동 재조합 부위를 나타낸다.

[0034] 2) *E. coli* JM109에 pKD46 플라스미드를 삽입한다.

[0035] 3) pKD46 플라스미드가 삽입된 *E. coli* JM109에 1)과정에서 증폭된 선형 DNA 템플릿을 삽입시킨 후 pKD46 플라스미드를 발현시킨다.

[0036] 4) 플립과아제 재조합 단백질을 발현하는 pCP20 플라스미드를 삽입한 후 발현시켜 기존 *E. coli* JM109에서 *waaF* 유전자만 제거된 균주를 완성하였다.

[0037] 2. *rcsF* 유전자 도입을 위한 유전자 클로닝

[0038] 본 발명에서는 콜라닌 산 수율을 향상시키기 위하여 *waaF* 결실 및 *rcsF* 발현의 시너지 효과를 조사하기 위해 추가로 대장균을 조작하였다. *rcsF* 유전자를 도입하기 위해 *rcsF* 유전자 시퀀스를 가지고 있는 대장균 K-12 MG1655 (DE3)를 37℃에서 LB 배지에서 성장시켰다. 16시간 동안 배양시킨 후 세포를 모으기 위해 원심분리기를 10,170 × g, 4℃로 설정하여 15분 동안 원심분리하였다. 균의 genomic DNA를 추출하기 위해 상업적 DNA 추출 키트 (GeneAll Biotechnology Co., Seoul)를 사용하였다. 다음과 같은 시퀀스를 가진 프라이머를 이용해 원하는 유전자 *rcsF* 부분을 증폭시켰다.

[0039] *rcsF*-N, 5'-AAAGGATCCATGCGTGCTTTACCGATCTGTTT-3' (서열번호 3); *rcsF*-C, 5'-AAACTCGAGTCATTTGCCGTAATGTTAAGCG-3' (서열번호 4). PCR 산물 및 pET21a 플라스미드 (Novagen, Madison, WI, USA)를 제한 효소 BamHI 및 XhoI를 사용하여 분해한 다음 T4 DNA 리가아제(BioLabs, MA, USA, MA)를 사용하여 *rcsF*와 pET21a를 결합시켰다. 전기적 충격에 의해 플라스미드를 균에 삽입시켰다. 그리고 LB-암피실린 배지를 이용해 콜로니를 선택적으로 취하였다.

표 1

Strain/Plasmid	Relevant description	Reference
Strain		
<i>E. coli</i> DH5 α	F-, ϕ 80d, lacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17(rK ⁻ mK ⁻), supE44, <i>thi</i> -1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF)U169	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	F' traD36 proA+B+ lacIq Δ (lacZ)M15/ Δ (lac-proAB), glnV44 e14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 <i>thi</i> -1 hsdR17	NEB (Ipswich, MA, USA)
<i>E. coli</i> Δ waaF	JM109(DE3) Δ waaF (<i>waaF</i> gene was deleted)	This study
<i>E. coli</i> pET21a	JM109(DE3) harboring pET21a	This study
<i>E. coli</i> <i>rcsF</i>	JM109(DE3) expressing <i>rcsF</i>	This study
<i>E. coli</i> Δ waaF+pET21a	JM109(DE3) Δ waaF harboring pET21a	This study
<i>E. coli</i> Δ waaF+ <i>rcsF</i>	JM109(DE3) Δ waaF expressing <i>rcsF</i>	This study
Plasmid		
pET21a	T7 promoter with MCS, pBR322 replicon, Amp ^R	Novagen (Burlington, MA, USA)
<i>prcsF</i>	pET21a harboring <i>rcsF</i>	This study

[0040]

[실시예 2] 재조합 대장균의 생장 곡선을 위한 600 nm에서의 흡광도 측정

[0043] 점성을 띤 배양 배지의 흡광도를 측정하기 위해 3차 증류수로 희석하여 측정하였다. 세포의 광학 밀도는 분광광도계 (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 48시간 발효 동안 6시간 간격으로 600 nm (OD₆₀₀)에서 측정되었다.

[실시예 3] 재조합 대장균이 생산하는 세포 외 다당류인 콜라닌산의 정량

[0046] 균 배양은 인큐베이터(250-mL 플라스크 또는 1-L 발효기(bioreactor))에서 배양 볼륨을 달리하여 25°C, 200 rpm으로 설정해 48시간 동안 진행되었으며(도 8), 1-L 발효기(bioreactor)에서 배양 시 air flow rate은 200 ml/min으로 설정하여 진행하였다. 48시간째 균 배양액 35 ml를 채취한 후 50 ml 코니컬 튜브에 넣었다. 세포 외 다당류를 분해하는 효소를 불활성화시키고 세포 표면에 있는 콜라닌산을 완전히 분리하기 위해 95°C에 10분 동안 불활성화시켰다. 그리고 아이스에서 열을 식힌 후, 35 ml 균배양액에서 상등액을 분리해내기 위해 원심분리기를 이용하여 원심분리하였다. 10,000 x g, 4°C, 30분 동안 원심분리를 실시한 후 상등액 10 ml를 30 ml의 차가운 에탄올에 넣어 콜라닌산을 침전시켰다. 4°C에서 약 16시간 동안 충분히 침전시킨 후 원심분리기를 이용해 4°C, 10,000 x g, 30분 동안 원심분리하여 침전물을 얻었다. 그리고 상등액인 에탄올을 완전히 제거한 후 침전물을 얻었다. 잔여 에탄올을 제거하기 위해 아이스에 튜브를 넣은 채로 휘발시켰다. 완전히 에탄올이 제거된 상태의 침전물을 이용해 콜라닌산을 정량하였다. 30 ml 3차 증류수에 침전물을 녹여 그 중 1ml로 콜라닌산 정량을 진행하였다. 이전 참고문헌에 따르면 (Ren G et al (2016) J Bacteriol. 198(11): 1576-1584; Blumenkrantz N et al (1973) Anal Biochem. 54(2): 484-489) 콜라닌산을 구성하는 단당 중 클루쿠론산을 중심으로 카운트하여 최종 콜라닌산의 적정 농도를 구하였다. 3차 증류수에 용해된 침전물 1ml에 95% 황산용액에 녹인 12.5 mM 소듐 테트라보레이트 (sodium tetraborate) 5 ml를 넣고 100 °C, 5분 동안 끓는물에 담근 다음 아이스에 넣어 충분히 식혀 주었다. 0.5% (w/v) 수산화나트륨에 1.5 g/L의 하이드록시다이페닐 (hydroxydiphenyl)을 녹인 용액 100 μ l를 첨가하고 충분히 잘 섞었다. 526 nm에서 측정된 값을 이용해 콜라닌산의 적정 농도를 구하였다.

[0048] [실시예 4] 최적화 배지에서의 세포배양 조건

[0049] 배양 실험을 위해 암피실린을 함유하는 Luria-Bertani (LB) 한천 플레이트로부터의 단일 콜로니를 선택하여 암피실린을 함유하는 10 mL의 LB 배양액에 접종하고, 37℃ 및 200 rpm에서 12 시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 그리고 세포 양을 많이 모으기 위해 암피실린을 함유하는 100 mL LB 배양액에 옮기고 세포를 37℃ 및 200 rpm에서 16시간 동안 추가로 배양하였다. 배양시 사용된 배지는 20 g/L 클루코스, 10.62 g/L 제이인산나트륨, 3 g/L 인산칼륨, 0.5 g/L 염화나트륨, 2.63 g/L 트립톤, 0.24 g/L 황산 마그네슘 및 0.011 g/L 염화칼슘으로 이루어져 있으며, 대한민국 특허 출원 제10-2019-0049226호에 따라 콜라닉 산 최대 생산을 위하여 최적화된 배지이다.

[0051] [실시예 5] *rcsF* 유전자 도입을 통한 콜라닉산 생산량의 변화

[0052] 콜라닉산 생산을 위한 *waaF* 유전자 deletion 및 *rcsF* 유전자 발현의 효과를 알아보기 위해 *waaF* 유전자가 deletion된 대장균에 *rcsF* 유전자를 추가로 도입한 균을 이용해 실험을 진행하였다. 생장 곡선 측면에서는 재조합 대장균이 모균주인 *E. coli* JM109(DE3)보다 낮은 생장을 보였고, 상대적으로 높은 콜라닉산을 생산하였다.

[0053] *waaF* 유전자가 deletion된 대장균에 *rcsF* 유전자를 추가로 도입한 경우, 기존에 *waaF* 유전자가 deletion된 대장균이 생산한 콜라닉산의 농도 및 수율보다 각각 약 1.4배 및 1.2배 높았다 (도 2). 이 결과를 바탕으로 *waaF* 유전자 deletion 및 *rcsF* 유전자를 추가로 도입한 *E. coli* $\Delta waaF rcsF$ 균주를 본 발명에서 콜라닉산 생산을 위한 실험에 사용하였다.

[0055] [실시예 6] 염화나트륨을 이용한 삼투압 스트레스가 콜라닉산 생산에 미치는 영향

[0056] 콜라닉산은 외막의 지방다당질 구조의 변화에 반응하여 합성된다. 삼투압 스트레스가 재조합 대장균이 생산하는 콜라닉산에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 염화나트륨을 이용해 실험을 진행하였다. 발효실험은 0부터 300 mM 범위의 다양한 농도의 염화나트륨을 최적화 배지에 추가하여 수행되었다.

[0057] 결과는 염화나트륨의 농도가 증가할수록 그에 대한 방어기작으로 콜라닉산을 생산하는 것이 아닌 오히려 콜라닉산 생산량이 감소하였다 (도 3). 관련된 이유를 추정한 결과 *waaF* 유전자 결실이 이미 세포막의 변형을 가져오기 때문에 추가로 삼투압 스트레스를 가할 경우 지나치게 스트레스를 받아 세포사멸로 이어진 것으로 예측되었다. 결국 염화나트륨은 콜라닉산 생산 증가에 도움을 주지 못하고 오히려 감소하는 효과를 주었다.

[0059] [실시예 7] 과산화수소를 이용한 산화스트레스가 콜라닉산 생산에 미치는 영향

[0060] *E. coli* $\Delta waaF rcsF$ 균주가 콜라닉산 생산 시 산화 스트레스가 미치는 영향을 알아보기 위해 과산화수소를 농도별로 배지에 첨가한 후, 발효를 통해 생산된 콜라닉산의 양상을 살펴보았다. 본 실험에서는 0, 0.5, 1, 5, 10, 20 및 50 mM 농도의 과산화수소를 배지에 추가해 재조합 대장균의 생장 곡선과 콜라닉산의 농도 및 수율 변화를 관찰했다. 그 결과, 과산화수소를 넣지 않은 대조군과 비교했을 때 20mM 과산화수소의 존재 하에서 콜라닉산의 농도가 1.2배 증가함을 확인하였다 (도 4). 삼투 스트레스와는 달리, 산화 스트레스는 콜라닉산 생성을 증가시키는 것으로 나타났다.

[0062] [실시예 8] pH 조건이 콜라닉산 생산에 미치는 영향

[0063] 최대의 콜라닉산을 얻기 위한 최적의 pH를 구하기 위해 1-L 발효기를 이용해 실험을 진행하였다. pH값이 5, 6, 7, 8에서 유지되도록 5M 염산과 5M 수산화나트륨을 이용했다. 생장 곡선을 통해 다른 pH 조건과 비교했을 때 pH 5와 pH 8에서 상대적으로 *E. coli* $\Delta waaF rcsF$ 균주의 생장이 저해되는 것으로 나타났다 (도 5). 이는 pH 5와 8이 대장균의 생장을 위한 최적 pH 범위를 벗어났기 때문이다. 여러 pH 조건 중에 pH 7에서 성장한 재조합 대장균이 생산한 콜라닉산의 적정 농도가 4351.6 mg/L로 가장 높았다 (도 5). pH 조절이 없는 대조군과 비교했을 때 약 1.4배 높았다. 결론적으로, 배지를 pH 7로 유지했을 때 최대 콜라닉산이 생산되었다. 이 실험을 통해 환경적 요인 중에 pH가 콜라닉산 생산을 크게 증가시키는 중요한 요소임을 증명하였다.

[0064] 위의 세 가지 다른 환경적인 요인 중에 pH 7.0과 20 mM 과산화수소 조건이 콜라닉산 생산량을 가장 높였기 때문

에 두 가지 조건을 동시에 가했을 때 콜라닉산 생산에 시너지 효과를 줄 수 있는지 확인했다. 그 결과 두 가지 조건을 동시에 가했을 때 생산되는 콜라닉산은 pH 7.0조건만 단일로 줬을 때보다 생산량이 오히려 낮았다 (도 6).

[0065] 본 발명을 통해 콜라닉산 생산에 영향을 미치는 유전적 및 환경적 요인들과 각 조건에서 얻은 콜라닉산의 농도 및 수율을 요약하여 정리했다 (도 7). 대장균 JM109(DE3)를 모균주로 사용하여, 이전 발명과 본 발명에서 유전적 및 환경적인 요인을 다양하게 변화시켜 나타나는 콜라닉산 생산량을 비교하였다. 실험 대조군으로서, 콜라닉산 적정 농도 및 수율 각각 79.5 mg/L 및 45.2 mg/g로 관찰되었다. 대장균 JM109(DE3)에서 *waaF*를 제거함으로써, 콜라닉산의 농도 및 수율은 각각 211.6 mg/L 및 460.4 mg/g DCW로 관찰되었다. *E. coli* $\Delta waaF$ 의 콜라닉산 생산을 높이기 위해 배양배지 조성을 최적화 한 후, 콜라닉산의 농도는 2052.8 mg/L, 수율은 2234.3 mg/g DCW이었다. 그 후, *rcsF*를 추가로 도입한 *E. coli* $\Delta waaF+rcsF$ 균주를 최적화 배지에서 배양했을 때 생성된 콜라닉산의 농도는 3051.2 mg/L이고 수율은 3744.1 mg/g DCW이었다.

[0066] 최종적으로, 본 발명에서 *E. coli* $\Delta waaF+rcsF$ 균주를 pH 7 조건에서 배양했을 때 최대 콜라닉산의 농도 및 수율인 4351.6 mg/L 및 5180.4 mg/g DCW의 콜라닉산을 얻었다. 특히 본 발명에서 얻은 콜라닉산 수율인 5180.4 mg/g DCW은 현재까지 보고된 값 중 가장 큰 값으로 그 의미가 크다.

[0067] 추가적으로, 인큐베이터(250-mL 플라스크 또는 1-L 발효기(bioreactor))에서 배양 볼륨을 달리하여 배양한 결과로는, 배양 볼륨이 작을수록 콜라닉 산의 생산 수율은 향상됨을 확인하였다. 구체적으로 250-mL 플라스크에서 50mL 배양 볼륨으로 발효하였을 때, 1-L 발효기(bioreactor)에서 300mL 배양 볼륨으로 발효하였을 때, 가장 높은 수율로 콜라닉 산이 생산됨을 확인하였다. (도 8)

도면

도면1

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



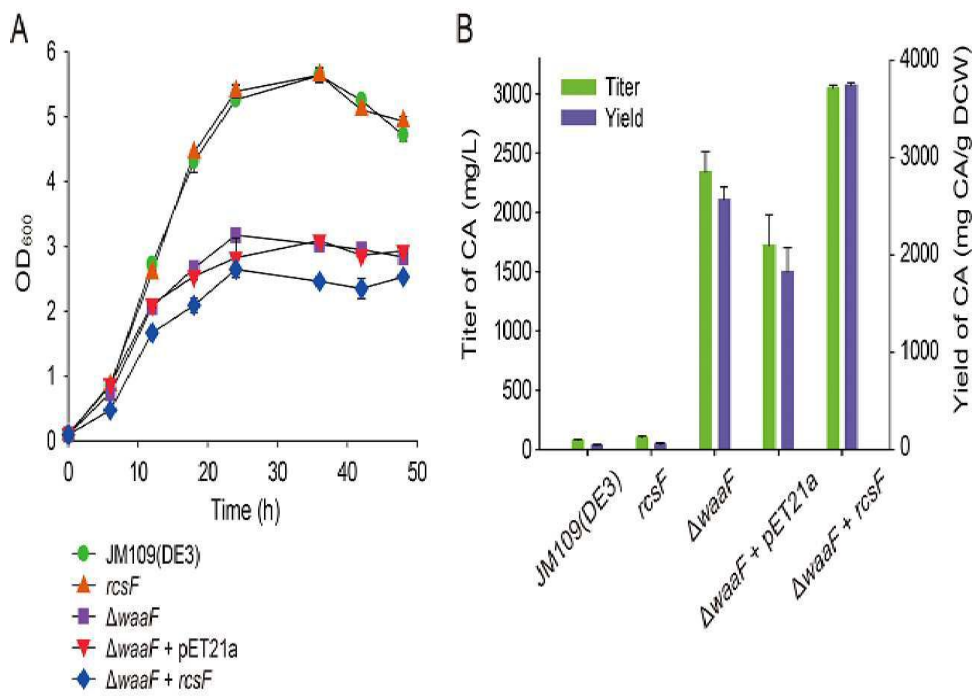
STEP 3. Select kanamycin-resistant transformants



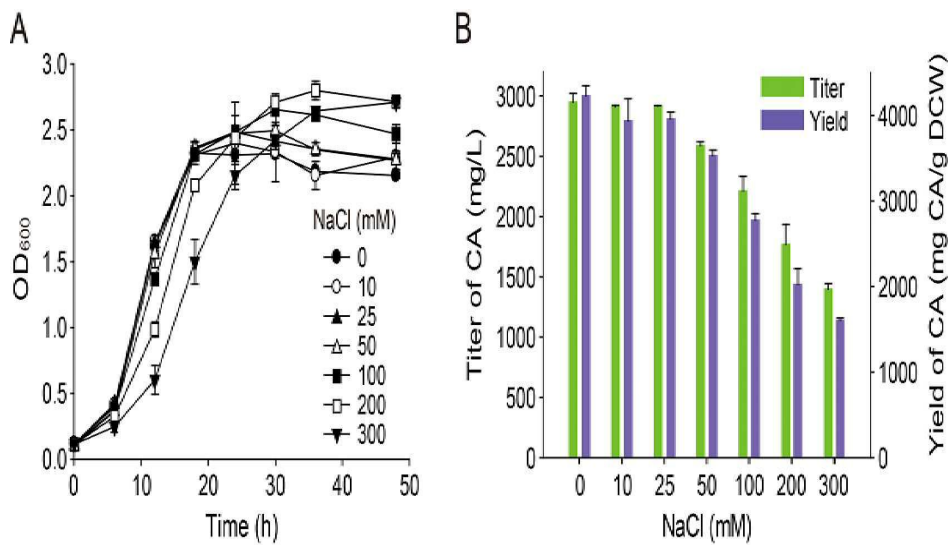
STEP 4. Eliminate kanamycin-resistance cassette by using a FLP expressing plasmid pCP20



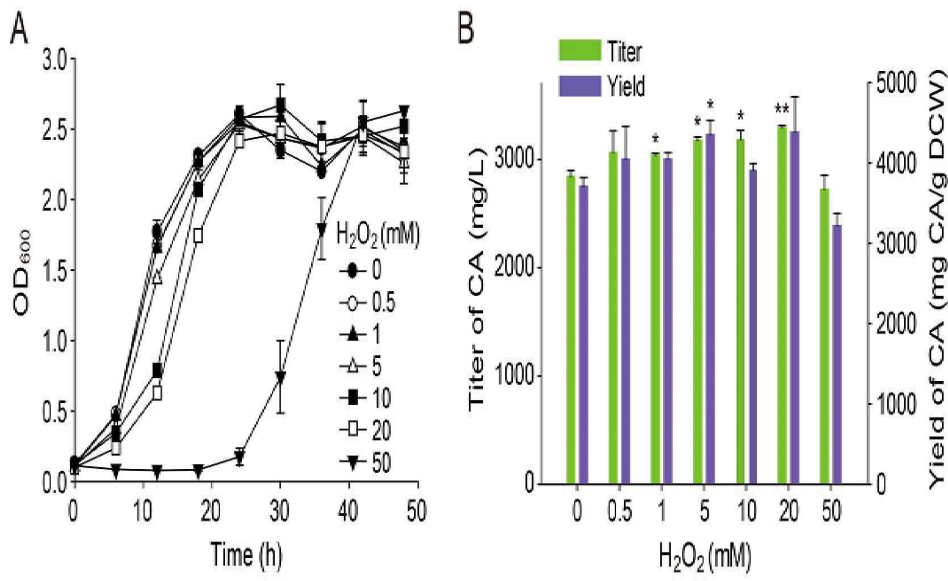
도면2



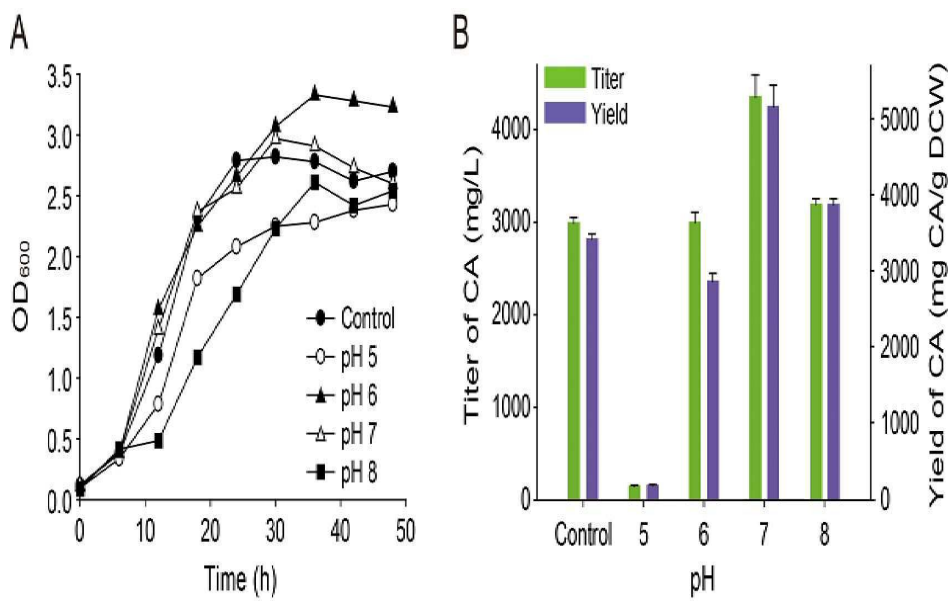
도면3



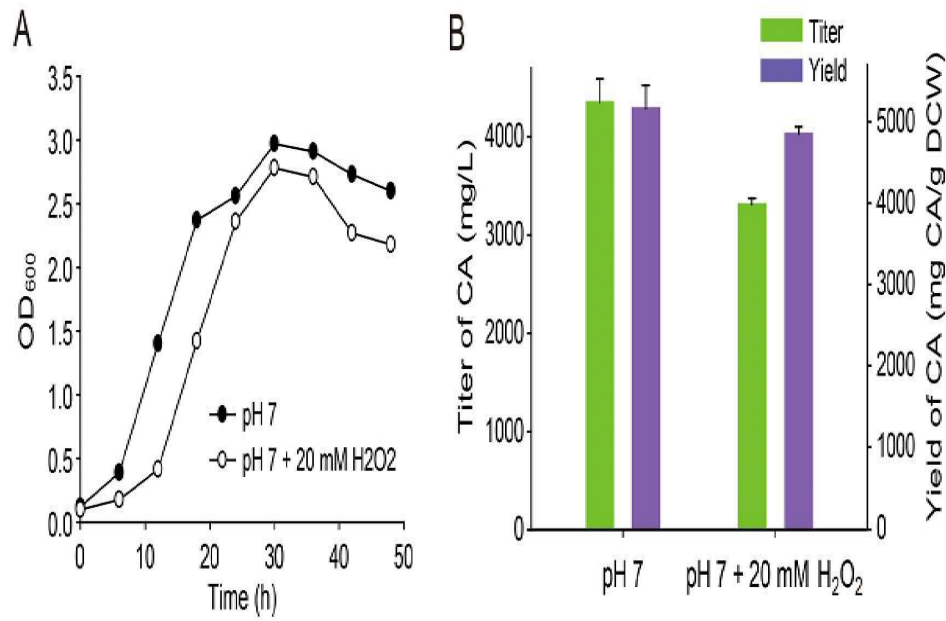
도면4



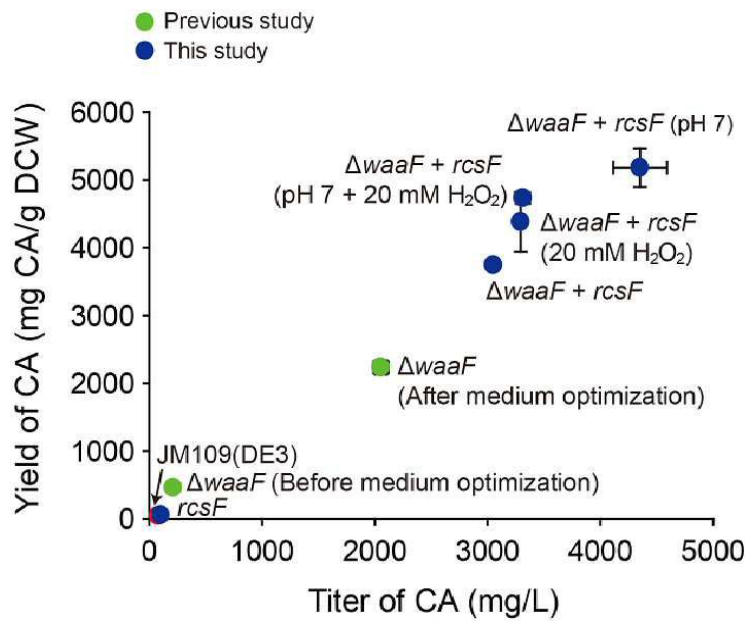
도면5



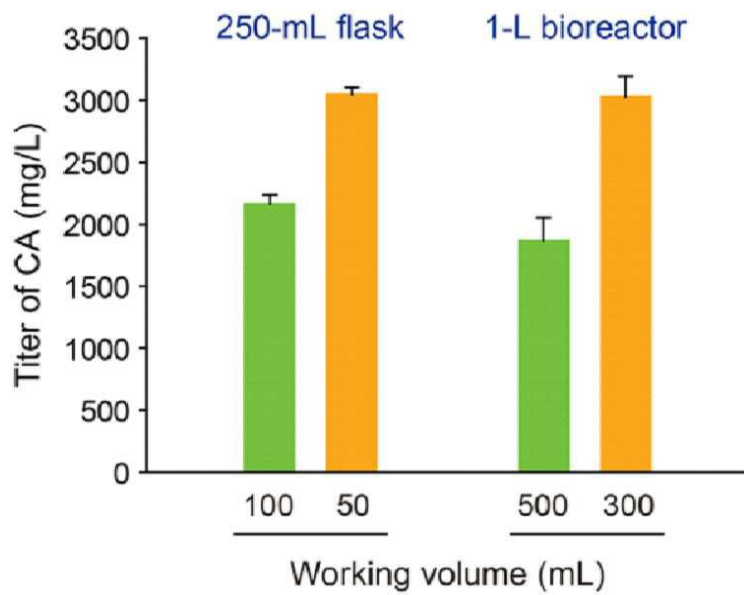
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Production of colanic acid by a mutant Escherichia coli

<130> P20U13C2076

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> waaF forward primer

<400> 1

atggtgccgt ccattattat cgcggatgcc ggaagttaac gaagctattc ttgtgtaggc 60

tggagctgct tc 72

<210> 2

<211> 70

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> waaF reverse primer

<400> 2

gataaccctc cgcagcgtea cctttacgca ctttgtgata gccggtaatc atgggaatta 60

gccatgggtcc	70
<210> 3	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> rcsF-N primer	
<400> 3	
aaaggatcca tgcgtgcttt accgatctgt tt	32
<210> 4	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223>	
> rcsF-C primer	
<400> 4	
aaactcgagt catttcgccg taatgttaag cg	32