



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0076165
(43) 공개일자 2011년07월06일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) *C12N 1/14* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0132798

(22) 출원일자 2009년12월29일

심사청구일자 2009년12월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김승욱

서울특별시 노원구 공릉동 737 삼익아파트
104-905

이환효

서울특별시 강서구 가양2동 가양3단지아파트 301
동 612호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한양특허법인

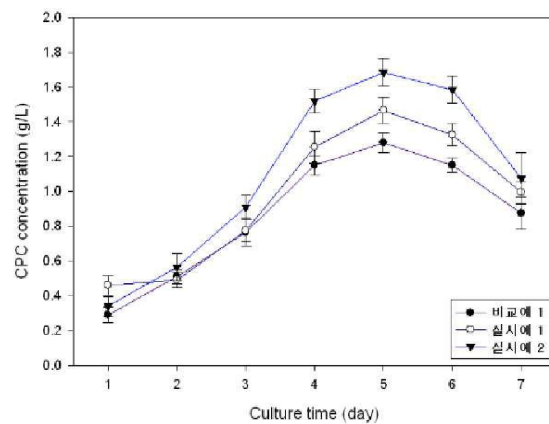
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 미생물의 배양방법

(57) 요약

본 발명은 미생물, 특히 균사체 미생물의 배양시 특정 비중의 고체 물질을 첨가하여 상기 미생물의 성장 또는 분화를 촉진함으로써 항생제와 같은 유용한 대사 산물의 생산성을 향상시키는 미생물의 배양 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

신현용

서울특별시 관악구 신림4동 503-7호

송윤석

서울특별시 양천구 신정1동 1029-35호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R1120000880500302008

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 우수연구센터(ERC)

연구과제명 [5-3] 균사체 미생물 현탁계에서 성장모델 및 유변특성 확립을 통한 생물반응기에의 응용

기여율

주관기관 고려대학교

연구기간 2008-03-01 ~ 2009-02-28

특허청구의 범위

청구항 1

미생물 배양시 비중이 0.9 내지 2.5인 고체 물질을 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 고체 물질은 실리콘인 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 고체 물질은 구형, 원통형, 원뿔형, 사다리꼴 원통형 또는 육면체형인 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 고체 물질은 평균직경이 0.1~100mm인 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 고체 물질은 상직경이 0.1~100mm, 하직경이 0.1~100mm, 높이가 0.1~100mm인 사다리꼴 원통형인 것을 특징으로 하는 미생물의 배양방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 미생물은 균사체 미생물인 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 균사체 미생물은 아크레모늄 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*)인 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 미생물은 진탕 또는 교반 배양하는 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 미생물은 150~500rpm, 20~35℃에서 48~240시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 미생물은 150~400rpm, 20~35℃에서 24~120시간 동안 미리 배양한 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물, 특히 균사체 미생물의 배양시 특정 비중의 고체 물질을 첨가하여 상기 미생물의 성장 또는 분화를 촉진함으로써 항생제와 같은 유용한 대사 산물의 생산성을 향상시키는 미생물의 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세팔로스포린은 세팔로스포린 C (이하, 'CPC') 화합물 유래의 β -락탐계 항생제로서, 균사체 미생물의 일종인 몰드 아크레모늄 크리소게눔(mold A.chrysogenum)의 발효에 의해 얻을 수 있다. CPC는 박테리아 질환의 치료용으로 널리 쓰이는 항생제의 원료이므로, 이를 생산하는 아크레모늄 크리소게눔은 매우 중요하다.

[0003] 종래 보고된 바에 따르면, 미생물의 성장과 대사 산물의 생성에는 미생물 배양시의 교반속도, 배플(baffle)의 유무와 모양, 배양기의 크기와 형태, 주입되는 공기의 양 등이 큰 영향을 미치는 것으로 되어 있는데, 이들 요소는 미생물의 물질 대사와 산소 전달율(OTR)에 깊은 관련을 가짐으로써 미생물의 성장과 대사 산물의 생성에 영향을 준다.

[0004] 미생물로부터 생산되는 대표적인 중요 물질 중 특히 항생제는 이러한 물리적인 배양 조건들과 밀접한 연관을 가진다. 예를 들어 아크레모늄 크리소게눔에 의한 CPC의 생산은 발효 과정에서의 형태학적인 특징 및 물리적인 자극 요소에 의해 증가될 수 있다. 사상균에서 펠렛 형태는 균의 배양시 산소, 매스 또는 열의 전달에 불리함이 보고되어 있는데, 집중적인 교반(agitation)과 같은 물리적인 자극을 주면 펠렛 크기가 축소되고 미생물의 분화가 증가하는 것이 보고되어 있다. 그러나 상기 교반의 경우에는 대사산물의 생산량이 낮은 등의 부정적인 측면도 알려져 있다. 이에 산소 전달율을 향상시킴으로써 대사 산물의 생산성을 증가시키기 위한 여러 실험들이 수행되었으나, 아직까지 만족할만한 결과를 얻지는 못한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명은 이러한 기술적 배경 하에서 고안된 것으로, 본 발명의 목적은 미생물의 세포 분산에 의한 산소 또는 열 전달율의 향상을 통해 미생물의 성장과 분화를 촉진함으로써 항생제와 같은 유용한 대사 산물의 생산성과 효율을 향상시킨 새로운 미생물의 배양 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미생물 배양시 비중이 0.9 내지 2.5인 고체 물질을 첨가하여 배양하는 미생물의 배양 방법을 제공한다.

[0007] 일 실시예에 따르면, 상기 고체 물질은 실리콘이다.

[0008] 일 실시예에 따르면, 상기 고체 물질은 구형, 원통형, 원뿔형, 사다리꼴 원통형 또는 육면체형이다.

[0009] 일 실시예에 따르면, 상기 고체 물질은 평균직경이 0.1~100mm이다.

[0010] 일 실시예에 따르면, 상기 고체 물질은 상직경이 0.1~100mm, 하직경이 0.1~100mm, 높이가 0.1~100mm인 사다리꼴 원통형이다.

[0011] 일 실시예에 따르면, 상기 미생물은 균사체 미생물이고, 바람직하게는 아크레모늄 크리소게눔이다.

[0012] 일 실시예에 따르면, 상기 미생물은 진탕 또는 교반 배양된다.

[0013] 일 실시예에 따르면, 상기 미생물은 150~500rpm, 20~35℃에서 48~240시간 동안 배양된다.

[0014] 일 실시예에 따르면, 상기 미생물은 150~400rpm, 20~35℃에서 24~120시간 동안 미리 배양된 것을 사용한다.

효 과

[0015] 본 발명의 미생물 배양방법은, 미생물 배양 시 특정 비중을 갖는 고체 물질을 첨가하여 상기 고체 물질의 운동성에 의해 미생물 세포를 잘 분산시키고 균사체의 형태학적 변화를 촉진시킨다. 그 결과 배양 중의 산소, 매스(mass) 또는 열의 전달에 긍정적인 영향을 미쳐 미생물의 성장 및 분화를 촉진함으로써, CPC와 같은 유용한 이차 대사 산물의 생산성 및 효율을 향상시키는 효과를 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0017]

[0018] 본 발명은 미생물 배양시 비중이 0.9 내지 2.5인 고체 물질을 첨가하여 배양하는 것을 특징으로 하는 미생물의 배양 방법을 제공한다.

[0019] 상기 고체 물질은 0.9 내지 2.5, 바람직하게는 1.0 내지 1.8, 더욱 바람직하게는 1.05 내지 1.5 범위의 특정 비중을 가짐으로써 적절한 운동성과 탄성 및 강도를 가진다. 따라서, 이를 미생물 배양 중에 첨가하는 경우 미생물 세포를 파괴하지 않으면서도 묻쳐있는 세포의 분산을 증가시킬 수 있으며, 그 형태학적인 변화를 촉진시킬 수 있다. 상기한 세포 분산과 형태학적인 변화는 배양 중의 산소, 열, 매스 전달율을 높여 미생물의 성장 및 분화를 촉진시키게 되며, 이는 CPC와 같은 대사 산물의 생산성 향상으로 이어질 수 있다.

[0020] 상기 고체 물질은 고체이기만 하면 그 종류에 특별히 한정이 없으나, 예를 들면 실리콘, 고분자, 유리 등을 들 수 있으며, 바람직하게는 실리콘일 수 있다. 이러한 고체 물질은 각각 단독으로 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.

[0021] 또한 상기 고체 물질은 그 형태 및 크기에 별다른 제한이 없으며, 당업자가 배양하고자 하는 미생물의 종류, 배양기의 크기, 배양액의 양 등에 따라 적절히 결정하여 사용할 수 있다.

[0022] 예를 들면, 상기 고체 물질로는 구형, 원통형, 원뿔형, 사다리꼴 원통형, 육면체형, 팔면체형 등의 형태를 갖는 것을 사용할 수 있다. 이 때 상기 사다리꼴 원통형은 상직경이 하직경보다 길 수도 있고, 하직경이 상직경보다 길 수도 있다. 바람직하게는 배양 중 미생물이 파괴되지 않도록 모서리가 날카롭지 않은 구형, 원통형 또는 사다리꼴 원통형의 것을 사용하는 것이 좋다.

[0023] 상기 고체 물질의 크기는 수 μm 내지 수백 mm일 수 있는데, 바람직하게는 평균직경(또는 가로, 세로, 높이)이 0.1~100mm, 더욱 바람직하게는 평균직경이 1~50mm, 더더욱 바람직하게는 평균직경이 2~20mm인 것을 사용할 수 있다. 미생물의 균사체 크기가 보통 수 μm 내지 수십 mm이므로, 고체 물질의 크기가 상기 범위 내에 있으면, 미생물 세포들의 더 효과적인 분산을 유도할 수 있다.

[0024] 본 발명의 실시예에서는 상기 고체 물질로서 도 1에 나타난 것과 같은 사다리꼴 원통형의 실리콘 고무를 사용하는데, 고체물질이 사다리꼴 원통형인 경우, 그 크기는 상직경이 0.1~100mm, 하직경이 0.1~100mm, 높이가 0.1~100mm인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 상직경이 1~50mm, 하직경이 1~50mm, 높이가 1~50mm인 것을 사용하며, 더더욱 바람직하게는 상직경이 2~20mm, 하직경이 2~20mm, 높이가 3~20mm인 것을 사용한다.

[0025] 이러한 고체 물질의 첨가량은 배양기의 크기, 배지의 양, 미생물의 종류 및 양 등에 따라 당업자가 적절히 결정할 수 있는데, 바람직하게는 전체 배양액 중 0.0001~30 부피%, 더 바람직하게는 0.001~10 부피%의 범위이다.

[0026] 예를 들어 미생물을 5L 배양기에서 배양하는 경우, 상직경이 0.1~100mm, 하직경이 0.1~100mm, 높이가 0.1~100mm인 사다리꼴 원통형의 고체 물질을 1개 내지 100개, 바람직하게는 2개 내지 50개, 더욱 바람직하게는 3개 내지 25개의 범위로 첨가할 수 있다.

[0027] 본 발명의 실시예에서는 5L의 생물반응기(배양기)에 상직경이 8mm, 하직경이 7mm, 높이가 9mm인 사다리꼴 원통형의 실리콘 고무 또는 상직경이 5mm, 하직경이 8mm, 높이가 8mm인 사다리꼴 원통형의 실리콘 고무를 각각 6개~12개 첨가하였는데, 실리콘을 많이 첨가할수록 향상된 CPC 생산량을 보여주었다.

[0028] 한편 본 발명에서, 상기 미생물은 호기성 미생물이면 특별히 한정하지 않으나, 균사체 미생물인 것이 바람직하

다. 상기 균사체 미생물의 예로는 아크레모늄 속 미생물을 들 수 있으며, 보다 바람직하게는 아크레모늄 크리소게눔을 들 수 있다.

[0029] 상기 미생물은 첨가한 고체 물질이 배양 공간 내에서 용이하게 이동할 수 있도록 진탕 배양 또는 교반 배양하는 것이 바람직하다.

[0030] 이 때 상기 배양 공간으로는 특별히 제한은 없으나 플라스크 배지, 미생물 배양기 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 교반형 미생물 배양기를 사용한다. 또한 배양 조건은 미생물의 종류, 배지의 종류 등에 따라 달라질 수 있으나, 예를 들면 150~500rpm, 20~35℃에서 48~240시간 동안 배양할 수 있다. 나아가 교반형 미생물 배양기에서 미생물을 배양하는 경우, 에어 유동률은 0.1~10.0vvm인 것이 좋다.

[0031] 또한 상기 미생물은 시드 배지(seed medium)에서 미리 배양한 것을 사용하는 것이 대사 산물의 생산성 면에서 바람직하다.

[0032] 이 때 상기의 시드 배지는 미생물의 종류에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어 아크레모늄 크리소게눔을 배양하는 경우, 기본 시드 배지(basal seed medium)로는 스크로오스, 글루코오스, 콘 스틱 리커(corn steep liquor; CSL) 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 구성된 것을 사용할 수 있고, 주 배지(main medium)로는 글루코오스, 콘 스틱 리커, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , ODL-메티오닌 및 미량원소 용액으로 구성된 것을 사용할 수 있다. 미생물의 형태학적 분화를 향상시키기 위하여, 상기 기본 시드 배지에 대두박, 면실가루, CaCO_3 를 더 첨가할 수도 있다.

[0033] 또한 상기 미생물의 선 배양 조건은 미생물의 종류, 배지의 종류 등에 따라 결정될 수 있으나, 예를 들면 150~400rpm, 20~35℃에서 24~120시간 동안 배양하는 것을 들 수 있다.

[0034] 이상과 같은 본 발명의 미생물 배양 방법에 의해 획득된 대사 산물의 생산량 향상은, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의한 대사 산물(예: CPC)의 농도 측정, 미생물 배양액의 용존 산소량(DO) 측정, 건조 균체량 측정 등을 통해 확인할 수 있다.

[0035]

[0036] 이하에서, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0037]

[실시예 1 내지 4: 고체 물질(실리콘) 첨가에 의한 미생물 배양]

[0038] 1. 미생물의 종류

[0039] 아크레모늄 크리소게눔 ATCC 20339(A.chrysogenumATCC20339)의 돌연변이 종인 아크레모늄 크리소게눔 M35

[0040]

[0041] 2. 배지와 배양 조건

[0042] 포테이토 덱스트로스 아가(potato dextrose agar: PDA) 실란트 상에 2주 마다 미생물을 이동시켜 보존 배양(stock culture)을 유지하였다. 기본 시드 배지는 2.5% 수크로오스, 1.0% 글루코오스, 2.5% 콘 스틱 리커 및 0.4% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 구성되었다. 미생물의 형태학적 분화를 향상시키기 위하여, 상기 기본 시드 배지에 3.0% 대두박(soy bean meal), 1.0% 면실가루 및 0.5% CaCO_3 를 첨가하였다.

[0043] 주 배지로는 1.95% 글루코오스, 5% 콘 스틱 리커, 0.8% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3% KH_2PO_4 , 0.5% K_2HPO_4 , 0.5% DL-메티오닌 및 0.4% 미량원소 용액으로 구성된 것을 사용하였다.

[0044] 기본 시드 배지에서 슈가, 콘 스틱 리커 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 다른 성분과 별도로 살균하고, 주 배지에서 슈가, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 DL-메티오닌을 다른 성분과 별도로 살균하였다. 상기 기본 시드 배지에 CaCO_3 등을 첨가하고, 살균하기 전에, 1N NaOH를 넣어 pH를 7.0으로 조절하였다. 상기 주 배지에 리놀레산 4%(v/v)를 추가하였다.

[0045] 기본 시드 배지 200ml를 함유하는 2L 삼각플라스크(Erlenmeyer flask) 내에서, 아크레모늄 크리소게눔 M35를 27℃, 280rpm으로 72시간 동안 미리 진탕 배양하였다. 이렇게 미리 배양된 시드 배지를 5L의 탱크 교반형 미생물 배양기(Kobiotech Co., Ltd., Korea)에 접종한 후, 340rpm, 27℃에서 7일간 배양시켰다. 이 때, 작동 볼륨은

3.0L이고, 에어 유동률은 1.2vvm이었다.

[0047]

[0048] 3. 실시예 1 내지 4

[0049]

미리 배양된 시드 배지를 미생물 배양기에 접종하여 미생물을 배양하기 전에, 상기 배양기 내에 실리콘 스톱퍼 (silicone stopper 1, Korea Ace Scientific Co., Ltd., Korea)로 제조된 높이 9mm, 상직경 8mm, 하직경 7mm인 실리콘 고무(비중: 1.12)를 각각 6개(실시예 1, 실리콘 고무 비중: 1.12), 12개(실시예 2, 실리콘 고무 비중: 1.1) 첨가하였다. 상기 실리콘 첨가물을 도 1에 나타내었다. 또한 높이 8mm, 상직경 5mm, 하직경 8mm의 실리콘 고무(비중: 1.18)를 각각 6개(실시예 3), 12개(실시예 4) 첨가하였다.

[0050]

[0051] [비교예 1: 교체 물질을 첨가하지 않은 미생물 배양]

[0052]

상기 실시예에서 실리콘 고무를 첨가하지 않은 것을 제외하고는 동일하게 미생물을 배양하였다.

[0053]

[0054] [실험예: 대사 산물의 생산량 향상 효과]

[0055]

실시예1, 실시예2, 비교예 1에 대하여 아래와 같은 분석을 행하였다.

[0056]

[0057] 1. 분석방법

[0058]

균사체의 건조 균체량은 하기와 같이 측정하였다:

[0059]

60mL의 배양액을 10분 동안 12,000g으로 원심 분리하고 상등액을 제거하였다. 상기 배양액에 30mL의 증류수를 첨가하여 볼텍스 믹서로 10초 동안 진탕한 다음, 같은 조건에서 원심 분리하였다. 상기 과정을 2회 반복한 후, 상등액으로부터 분리된 침전물을 80℃에서 60시간 동안 건조하였다.

[0060]

CPC 농도는 역상 컬럼의 μ Bondapak C-18과 254nm로 설정된 UV 검출기를 이용하는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, Young Lin M930, Young Lin Instrument Co., Korea)로 측정하였다. 아세트니트릴-포스페이트 버퍼를 이동상으로 사용하였다. 용리 혼합물로는 0.9 mL/min의 유동률을 갖는 98% (v/v) 포스페이트 버퍼와 2% (v/v) 아세트니트릴을 이용하였고, CPC 징크염(Sigma, USA)을 표준시료로 사용하였다.

[0061]

DO는 5L의 탱크 교반형 미생물 배양기에 부착된 DO meter와 recorder (Kobiotech Co., Ltd., Korea)를 이용하여 2 시간 간격으로 측정하였다.

[0062]

[0063] 2. 결과

[0064]

도 2는 실시예 1, 실시예 2, 비교예에서 배양기 내의 아크레모늄 크리스게눔 M35에 의해 생산된 CPC 농도를 시간대별로 나타낸 것이다. 도 2를 참조하면, 주 배지에 실리콘 고무 12개를 넣은 실시예 2의 경우, CPC 농도의 최대값이 배양 5일째 되는 날에 나타났고, 이 때 CPC 농도가 1.7g/L임을 알 수 있다. 이 값은 실리콘 고무를 넣지 않는 비교예와 비교할 때 30.2% 증가한 것이다.

[0065]

도 3은 실시예 1, 실시예 2, 비교예에서 아크레모늄 크리스게눔 M35가 배양되는 동안의 건조 균체량을 시간대별로 나타낸 것이다. 도 3을 참조하면, 실리콘 고무를 첨가하는 경우(실시예 1, 2), 그렇지 않은 경우(비교예)보다 건조 균체량이 증가함을 알 수 있다. 구체적으로 비교예의 경우에는 1일째 되는 날에 건조 균체량이 14.2g/L이었고, 4일째 되는 날에 건조균체량이 25.2g/L이었던 반면, 실리콘 고무를 12개 첨가한 실시예 2의 경우에는 4일째 되는 날에 건조균체량이 27.8g/L이다.

[0066]

도 4는 실시예 1, 실시예 2, 비교예에서 아크레모늄 크리스게눔에 의해 변화된 OTR을 측정하는데 이용되는 용존 산소(DO)를 시간대별로 나타낸 것이다. 도 4를 참조하면, 실리콘 고무가 투입된 실시예에서의 DO 레벨은 실리콘 첨가물이 투입되지 않은 비교예보다 작음을 알 수 있다. 또한, 도 4에 의하면, 아크레모늄 크리스게눔 M35의 지수기가 시작될 때, 용존산소의 값은 감소하고, 팽창된 균사 단편이 급격하게 증가되는 것을 볼 수 있다.

[0067]

[0068] 이러한 결과로부터 균사체 분산의 상당부분은 실리콘 첨가물의 예측하지 못한 운동에서 기인한 것임을 알 수 있다. 그리고 실리콘 첨가물에 의한 균사체의 분산이 액침 배양 내에서 사상균의 한 종류인 아크레모늄 크리소게눔 M35의 산소 또는 열 전달에 이점으로 작용하고, 세포 성장과 미생물의 분화를 향상시킨다고 예측할 수 있다. 특히 실리콘 첨가물은 세포 펠렛의 중심에서, OTR을 위해 균사체의 표면영역을 증가시켰다고 여겨진다. 또한, 세포 성장이 향상된 것은 실리콘 첨가물이 투입된 배양기에서의 산소 전달에 의한 효과로 여겨진다.

[0069] 결론적으로 고체 물질, 즉 실리콘 첨가물을 이용한 배양은 균사체의 분산을 향상시키고, 산소 및 매스 전달에 영향을 줌으로써, 미생물의 분화 및 형태학적 변화를 촉진시켜 CPC와 같은 대사 산물의 생산성을 향상시킴을 확인할 수 있다.

[0070]

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 실시예에서 미생물 배양시 첨가된 실리콘 고무를 나타낸 사진이다.

[0072] 도 2는 실시예 1, 실시예 2, 비교예 1에서 배양기 내의 아크레모늄 크리소게눔 M35에 의해 생산된 CPC 농도를 시간대별로 나타낸 것이다.

[0073] 도 3은 실시예 1, 실시예 2, 비교예 1에서 아크레모늄 크리소게눔 M35가 배양되는 동안의 건조 균체량을 시간대별로 나타낸 것이다.

[0074] 도 4는 실시예 1, 실시예 2, 비교예 1에서 아크레모늄 크리소게눔에 의해 변화된 OTR을 측정하는데 이용되는 용존산소(DO)를 시간대별로 나타낸 것이다.

[0075]

[0076]

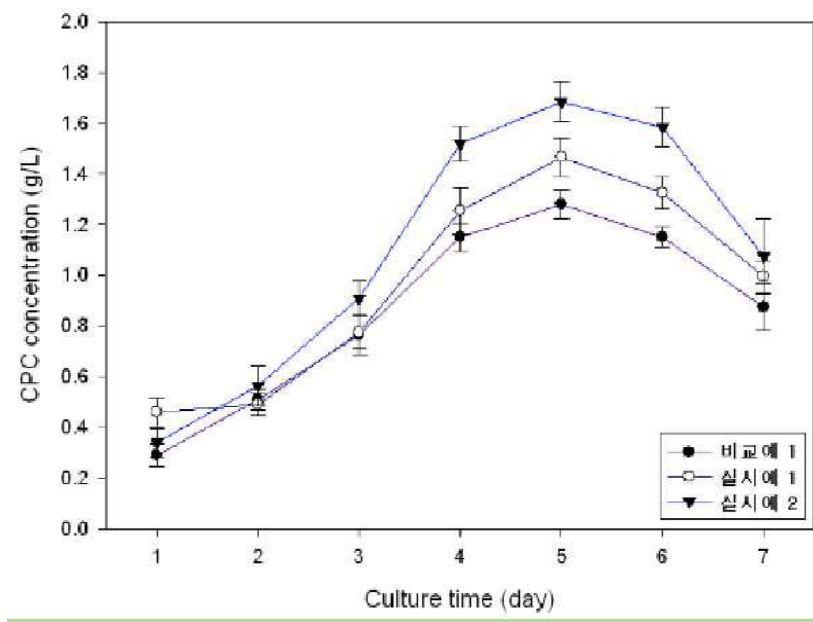
[0077]

도면

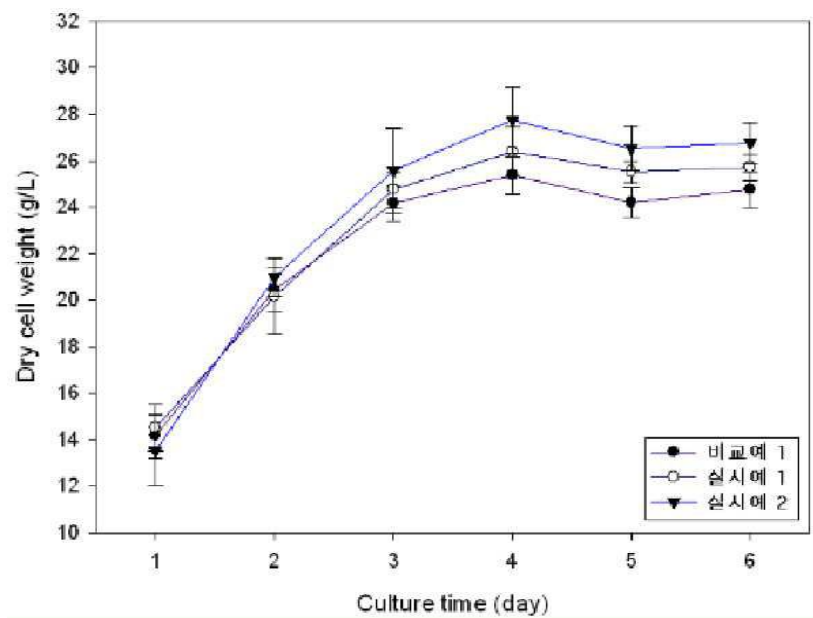
도면1



도면2



도면3



도면4

