(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월13일
(11) 등록번호 10-2695293
(24) 등록일자 2024년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7035103
(22) 출원일자(국제) 2016년05월04일
심사청구일자 2021년05월04일
(85) 번역문제출일자 2017년12월05일
(65) 공개번호 10-2018-0002826
(43) 공개일자 2018년01월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/030721
(87) 국제공개번호 WO 2016/179249
국제공개일자 2016년11월10일
(30) 우선권주장
62/157,101 2015년05월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US4628030 A
US4933281 A
US5501966 A

(73) 특허권자
스테판 컴파니
미국 60062 일리노이주 노스브룩 스코키 불러바드 1101
(72) 발명자
로히탄, 나타풍
미국, 20152 버지니아, 샹티이, 레이크 쇼어 스퀘어 25260 유닛 205
(74) 대리인
이원희

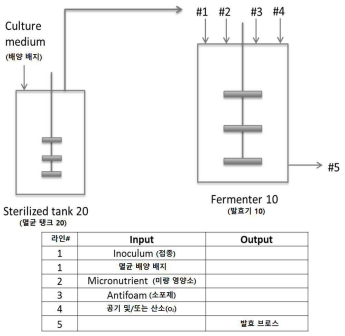
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **높은 수율 및 역가로의 람노리피드 생산을 위한 반연속 프로세스**

(57) 요 약

본 발명은 람노리피드 제조를 위하여, 람노리피드 생성 미생물의 반 연속 발효 방법을 제공한다. 상기 발효는 배치(회분식) 공정으로 수행 될 수 있지만, 발효가 끝날 시점에, 하나 이상의 람노리피드를 포함하는 발효 배지 중 적어도 약 70%가 취출되고, 새로운 배양 배지(공급 원료)가 대체물로서 공급된다. 이 공정은 RL 수율 및 역가를 소실시키지 않고 적어도 약 1 개월 동안 반복될 수 있다. 이 방법은 발효기를 배치(회분식) 및 공급 배치(유가식) 발효 전략에 비해 세척을 위한 가동 중단 시간을 줄이면서, 보다 높은 용량으로 활용될 수 있게 한다.

대 표 도



라인#	Input	Output
1	Inoculum (접종)	
1	멸균 배양 배지	
2	Micronutrient (미량 영양소)	
3	Antifoam (소포제)	
4	공기 및/또는 산소(O2)	
5		발효 브로스

명 세 서

청구범위

청구항 1

람노리피드를 포함하는 복수의 발효 배지의 반연속 생산 방법으로서, 상기 방법은,

(a) 람노리피드를 포함하는 발효 배지를 수득하기 위하여, 2일 내지 5일 동안 배양 배지에서 람노리피드를 생산하는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)을 배양하는 단계로서, 상기 배양 배지는,

(i) 6 내지 12 중량% 농도의 적어도 하나의 탄소 공급원;

(ii) 1 내지 4 g/L의 적어도 하나의 질소 공급원;

(iii) 1 내지 3 g/L의 적어도 하나의 인 공급원;

(iv) 0.001 내지 2 g/L의 적어도 하나의 마그네슘 공급원;

(v) 0.1 내지 1 g/L의 적어도 하나의 포타슘 공급원;

(vi) 0.1 내지 1 g/L의 적어도 하나의 황 공급원;

(vii) 0.1 내지 1 g/L의 적어도 하나의 염화물 공급원;

(viii) 1 내지 10 g/L의 적어도 하나의 소듐 공급원;

(ix) 0.1 내지 20 중량%의 양으로 존재하는 유화제; 및

(x) 미량영양소(micronutrient) 조성물 형태로 첨가되는, 배양 배지 L당 총 20 mg/L 이하의 농도로 존재하는 미량영양소를 포함하는 것인, 단계;

(b) 단계 (a)에서 수득된, 람노리피드를 포함하는 발효 배지의 적어도 70%를 제거하는 단계;

(c) 단계 (a)에서 설정된 조성을 가지는 배양 배지로, 단계 (b)에서 제거된, 람노리피드를 포함하는 상기 발효 배지를 대체하는 단계;

(d) 람노리피드를 포함하는 후속 발효 배지를 수득하기 위해, 적어도 1회 이상 상기 (a) 내지 (c) 단계를 반복하는 단계,

를 포함하고,

적어도 45 g/L의 람노리피드가 생산되며,

(i) 상기 적어도 하나의 탄소원은 글루코즈, 지방 알코올, 지방산, 또는 식물성 오일이고, 여기서 상기 식물성 오일은 올리브유, 유채유, 옥수수유, 해바라기유, 카놀라유, 또는 대두유이며;

(ii) 상기 적어도 하나의 질소원은 $NaNO_3$, 우레아 또는 NH_4Cl이고;

(iii) 상기 적어도 하나의 인 공급원은 H_3PO_4 또는 K_2HPO_4이고;

(iv) 상기 적어도 하나의 마그네슘원은 $MgSO_4*7H_2O$ 또는 $MgCl_2$이고;

(v) 상기 적어도 하나의 포타슘원은 KCl 또는 KOH이고;

(vi) 상기 적어도 하나의 황 공급원은 H_2SO_4이고;

(vii) 상기 적어도 하나의 염화물 공급원은 KCl 또는 NaCl이고;

(viii) 상기 적어도 하나의 소듐 공급원은 NaCl, $NaNO_3$, 또는 NaOH인,

방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배양 배지에

(xi) 거품 억제제; 를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 미량영양소 조성물은,

상기 미량 영양소를 포함하는 조성물의 0.1 내지 1 g/L의 양으로 존재하는 Fe 염;

상기 미량 영양소를 포함하는 조성물의 0.1 내지 1.5 g/L의 양으로 존재하는 Mn 염;

상기 미량 영양소를 포함하는 조성물의 0.5 g/L의 양으로 존재하는 Zn 염;

상기 미량 영양소를 포함하는 조성물의 1 내지 5 g/L의 양으로 존재하는 Na 염; 및

상기 미량 영양소를 포함하는 조성물의 0.5 내지 3 g/L의 양으로 존재하는 Cu염으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나를 포함하고,

상기 Fe 염은 $FeCl_3*6H_2O$ 또는 $FeSO_4$이고;

상기 Mn 염은 $MnSO_4*H_2O$ 또는 $MnCl_2*4H_2O$이고;

상기 Zn 염은 $ZnSO_4*7H_2O$ 또는 $ZnCl_2$이고;

상기 Na 염은 $Na_3C_6H_5O_7*2H_2O$, $NaC_6H_7O_7$, 또는 $Na_2C_6H_6O_7$이고;

상기 Cu 염은 $CuCl_2*2H_2O$ 또는 CuSO4*$5H_2O$인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 미량영양소 조성물은 연속적으로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 미량영양소 조성물은 하루에 한 번씩 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 30 내지 37℃의 온도, 6 내지 8.6의 pH, 또는 30 내지 37℃의 온도 및 6 내지 8.6의 pH에서 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 단계 (d)는 적어도 30일 동안 반복되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 미량영양소 조성물은 용액인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제2항에 있어서,

상기 거품 억제제는 탄소 기반의 또는 실리콘 기반의 거품 억제제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 유화제는 아라빅 검 또는 구아 검인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 람노리피드를 생산하기 위한 람노리피드 생성 미생물의 반연속 발효 방법을 제공한다. 상기 발효는 배치 공정으로 수행될 수 있지만, 발효의 종료 시점에, 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 상기 발효 배지의 적어도 약 70%가 추출되고, 새로운 배양 배지(공급원료)가 대체물로서 공급된다.

배 경 기 술

[0002] 서로 다른 두 액체 사이의 표면 장력을 낮추는 성질을 가진 람노리피드(RL; Rhamnolipids)는 유화제, 세제 및 발포제로 널리 사용된다. 람노리피드는 오염된 토양에서 원유를 효율적으로 제거 할 수 있고 "EOR(enhanced oil recovery)"라고 불리는 유화 특성으로 인해 기름 유출의 생물학적 복원을 촉진할 수 있다. 그들은 또한 항균성 및 항진균성으로 인해 농업에 사용되었다. 람노리피드는 현재 ZONIX로 판매되는 농업용 항균 제품 및 저장 탱크에서 오일을 정화하는 산업용 클리닝 제품 RECO에서 사용된다.

[0003] 슈도모나스(Pseudomonas) 속과 대장균(E. coli)은 다양한 탄소와 질소 공급원으로부터 람노리피드(rhamnolipid, RL)를 생산할 수 있는 것으로 나타났다. 슈도모나스(Pseudomonas) 속은 대장균보다 높은 RL 수율과 역가(titer, 역가)를 생성하지만, 이러한 RL 농도는 발효 과정을 상업적으로 실행 가능하게 하기에 충분하지 않다. 다양한 탄소원, 유전 변형 균주 및 발효 전략을 포함하여 RL 생산성을 높이기 위한 많은 접근법이 수행되어 가장 효과

적인 경로로 여겨지고 있다.

[0004] 배치(회분식)와 공급 배치(유가식) 발효는 슈도모나스를 사용하는 가장 흔한 발효 프로세스이다[7-11]. 회분식 발효는 가장 간단한 배양 방법으로 공급 원료(탄소원)를 처음에 접종물(inoculum)과 발효기에 함께 첨가하는 방법이다[7,8]. 상기 발효는 미생물에 의해 원료가 모두 활용될 때까지 이루어지며, 이후 발효기는 정지되고 새로운 배치가 시작된다[9]. 반면에, 공급 배치(유가식)는 배치 발효이지만, 공급 원료가 완전히 활용된 후, 발효 과정 동안 공급 원료(탄소 공급원)가 첨가된다[9-11]. 가장 최근에 보고된 최선의 RL 역가(생산성)는 녹농균(P. aeruginosa)의 유가식 발효에서 얻은 약 0.58-0.72 g/L/h이다[10]. 그러나, 이 공정은 새로운 공급 배치를 시동하기에 앞서, 90-120 시간 후 발효기를 정지시켜야 한다. 유사하게, 미국 특허 제 5,658,973 호는 작동하기에는 너무 긴 167 시간 후에 생산되는 78 g/L의 람노리피드를 보고했다.

[0005] **표 1: 녹농균(P. aeruginosa)에 의한 다양한 람노리피드(RL) 발효 공정의 요약**

표 1

[0006]

발효 타입	RL (g/L)	발효 시간 (h)	RL 역가 (g/L/h)	참조
배치(회분식)	70	144	0.49	[7]
배치	78	167	0.47	[8]
공급 배치 (유가식)	65	90	0.72	[10]
공급 배치	70	120	0.58	[10]
공급 배치	4.1	72	0.06	[11]
고체 상	46	288	0.16	[12]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 발효기를 배치(회분식) 및 공급 배치(유가식) 발효 전략에 비해 세척을 위한 가동 중단 시간을 줄이면서, 보다 높은 용량으로 활용될 수 있는 람노리피드 제조를 위한 방법으로서, 람노리피드 생성 미생물의 반연속 발효 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본원에서, 하기 단계를 포함하는, 하나 또는 그 이성의 람노리피드를 포함하는 복수의 발효 배지의 반연속 생산 방법:

[0009] (a) 람노리피드를 포함하는 제1 발효 배지를 수득하기 위하여, 글루코즈, 지방 알코올, 지방산과 같은 적어도 하나의 탄소원, 또는 올리브유, 유채유, 옥수수유, 해바리기유, 카놀라유, 및 대두유와 같은 식물성 오일; $NaNO_3$, 우레아 및 NH_4Cl과 같은 적어도 하나의 질소원; H_3PO_4 및 K_2HPO_4와 같은 적어도 하나의 인 공급원; $MgSO_4*7H_2O$ 및 $MgCl_2$와 같은 적어도 하나의 마그네슘원; KCl 및 KOH와 같은 적어도 하나의 포타슘원; H_2SO_4와 같은 적어도 하나의 황 공급원; KCl 및 NaCl와 같은 적어도 하나의 염화물 공급원; 및 NaCl, $NaNO_3$, 및 NaOH와 같은 적어도 하나의 소듐 공급원과, 선택적으로 아라빅 검, 구아 검, 람노리피드와 같은 유화제를 포함하는 배양 배지에서 약 2 내지 5일 사이로 람노리피드 생산 미생물을 배양하는 단계;

[0010] (b) 상기 단계 (a)에서 수득된, 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 배양 배지의 적어도 약 70%를 제거하는 단계;

[0011] (c) 상기 단계 (a)에서 설정된 조성을 가지는 배양 배지로, 상기 단계(b)에서 제거된, 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 상기 발효 배지를 대체하는 단계;

[0012] (d) 람노리피드를 포함하는 후속 발효 배지를 수득하기 위해, 적어도 1회 이상 상기 단계 (a)-(c)를 반복하는 단계이되,

[0013] 여기서, 상기 단계 (a)-(c)는 적어도 약 30일 동안 반복될 수 있다.

[0014] 특정 실시 양태에서, 상기 람노리피드 생성 미생물은 약 25 내지 40 ℃의 온도, 보다 특히 약 30 내지 37 ℃의 온도 및/또는 약 5.5 내지 약 9의 pH에서, 보다 특히 pH가 약 6-8.6에서 배양될 수 잇다. 상기 단계 (c)에서 새로운 배양 배지가 대체된 후의 발효 시작시의 pH는 특정 실시 양태에서 약 6-7, 바람직하게는 6.2-6.5일 수 있다. 발효의 pH는 발효 과정에서 조절할 필요가 없다.

[0015] 또 다른 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 하나 또는 그 이상의 미량 영양소를 포함하는 조성물을 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시 양태에서, 상기 미량 영양소는 약 20 mg/L 이하로 존재한다. 특정 실시 양태에서, 상기 미량 영양소는 약 1 mg/L 내지 약 14 mg/L 사이에 존재한다. 상기 조성물은 하루당 전체 발효 체적의 0.1 % v/v로, 매일 또는 연속적으로 첨가될 수 있다.

[0016] 상기 방법은 소포제를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 소포제는 탄소 또는 실리콘 기반의 소포제일 수 있다.

[0017] 상기 개시된 공정은 발효를 배치(회분식) 공정으로 수행할 수 있게 하지만, 발효의 마지막에, 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 발효 배지의 적어도 약 70 %를 취출(draw)하고, 여기에 이의 대체물로 새로운 배양 배지(공급 원료(feedstock))를 공급한다. 이 공정(단계 (d))은 RL 수율 및 역가를 소실시키지 않고 적어도 약 1 개월 동안 반복될 수 있고, 또 다른 구현 예에서는 약 180일까지 반복될 수 있다. 이는 발효기를 회분식 및 유가식 발효 전략에 비해 세척을 위한 가동 중단 시간을 줄이면서 보다 높은 용량으로 활용할 수 있게 합니다. 전술한 바와 같이, 상기 공정 단계 (d)는 적어도 한번 반복된다. 특정 구현 예에서, 상기 공정 단계 (d)는 적어도 5 회 반복된다.

[0018] 특정 실시 양태에서, 상기 방법은 약 1.6 g/L/h만큼 높은 람노리피드 생산성 (역가)으로 약 45 g/L 이상, 보다 특히 약 60-80 g/L의 람노리피드 농도를 생성한다. 특정 양태에서, 상기 탄소원이 오일인 경우, 단계 (b)에서 검출된 약 0.8 % w/v 이하의 잔류 오일 조성물만이 존재한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 람노리피드 제조를 위하여, 람노리피드 생성 미생물의 반 연속 발효 방법을 제공한다. 상기 발효는 배치(회분식) 공정으로 수행 될 수 있지만, 발효가 끝날 시점에, 하나 이상의 람노리피드를 포함하는 발효 배지 중 적어도 약 70%가 취출되고, 새로운 배양 배지(공급 원료)가 대체물로서 공급된다. 이 공정은 RL 수율 및 역가를 소실시키지 않고 적어도 약 1 개월 동안 반복될 수 있다. 이 방법은 발효기를 배치(회분식) 및 공급 배치(유가식) 발효 전략에 비해 세척을 위한 가동 중단 시간을 줄이면서, 보다 높은 용량으로 활용될 수 있게 한다.

[0020]

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 람노리피드를 생산하기 위한 반-연속 발효 방법의 개략도이다.

도 2는 실시예 4에서 30일 이상 반복되는 단계 (a) - (c)의 발효 과정 동안의 pH의 변화를 나타낸다.

도 3은 실시예 5에서 접종 후 또는 새로운 배양 배지로 충전한 후의 발효 과정 동안의 pH의 변화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] **정의**

[0023] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥상 명확하게 지시되지 않는 한 하한 단위의 10 분의 1까지, 상기 범위의 상한 및 하한 사이의, 각각의 사이 값과 상기 명시된 범위 내의 임의의 다른 언급된 또는 개재된 값이 본 발명에 포함되는 것으로 이해된다. 이러한 작은 범위의 상한값 및 하한값은 독립적으로 상기 작은 범위에 포함될 수 있으며, 역시 명시된 범위에서 특별히 배제된 한계를 조건으로 하여, 본 발명에 포함된다. 여기서, 언급된 범위가 하나 또는 둘 모두의 한계를 포함하는 경우, 포함된 한계 중 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위도 본 발명에 포함된다.

[0024] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 또한 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 지금부터 기술된다.

[0025] 본 명세서에 인용된 모든 간행물 및 특허(참조, 참조문헌)는 그 전체가 참고 문헌으로 인용된다. 본 발명이 선

행 발명에 의해 그러한 개시보다 시기 적절할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 참고 문헌에 수록된 내용이 본원과 모순되거나 불일치하는 경우, 본원은 그러한 내용을 대신할 것이다.

[0026] 본원(명세서) 및 첨부된 청구의 범위에서 사용되는 단수 형태 "a(하나)", "an(한)"및 "the(상기)"는 문맥상 다르게 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다는 것을 알아야 한다.

[0027] 달리 지시되지 않는 한, 일련의 요소들에 선행하는 "적어도"라는 용어는 그 시리즈의 모든 요소를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 일상적인 실험만을 사용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 구체예에 대한 많은 균등물을 인식 할 수 있거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 본 명세서 및 후속하는 청구 범위 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구하지 않는 한, "포함"이라는 단어 및 "포함하다"및 "포함하는"과 같은 변형은 언급 된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 군을 포함하지만 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 군을 배제하지는 않는다는 것을 의미하는 것으로 이해 될 것이다. 따라서 "포함하는", "포함하다", "함유하다", "가지고 있다" 등의 용어는 제한 없이 광범위하게 또는 개방적으로 읽혀야 한다. 본원에서 사용 된 용어 "포함하는"은 용어 "함유하는"또는 때로는 용어 "가지는"과 함께 대체 될 수 있다.

[0028] 본원에서 정의 된 바와 같이, "람노리피드"는 하나 또는 그 이상의, 전형적으로 선형, 포화 또는 불포화 β-하이드록시-카복실산 잔기 및 람노즈의 하나 또는 그 이상의 단위의 당 부분을 포함하는 지질 부분을 갖는 글리코리피드를 지칭한다.

[0029] 상기 사카라이드 부분과 상기 지질 부분은 상기 사카라이드 부분의 람노즈 잔기의 1-OH 기와 지질 부분의 β-하이드록시 카복실산의 3-OH 기 사이의 β-글리코시드 결합을 통해 연결된다. 따라서, 하나의 카르복실산 잔기의 카르복실 기가 람노리피드의 말단을 정의한다. 하나 이상의 람노즈-잔기가 람노리피드에 포함되는 경우, 지질 부분에 연결되지 않은 람노즈 잔기 각각은 1,4 β-글리코시드 결합을 통해 또 다른 람노즈 잔기에 연결된다. 2개 이상의 β-하이드록시-카복실산이 람노리피드에 존재하는 구체예에서, 상기 β-하이드록시-카복실산 잔기는 서로 독립적으로 선택된다. 각각의 복수의 β-하이드록시 카복실산 잔기의 β-하이드록시 카복실산 잔기는 일부 실시 양태에서 동일할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이들은 서로 상이하다.

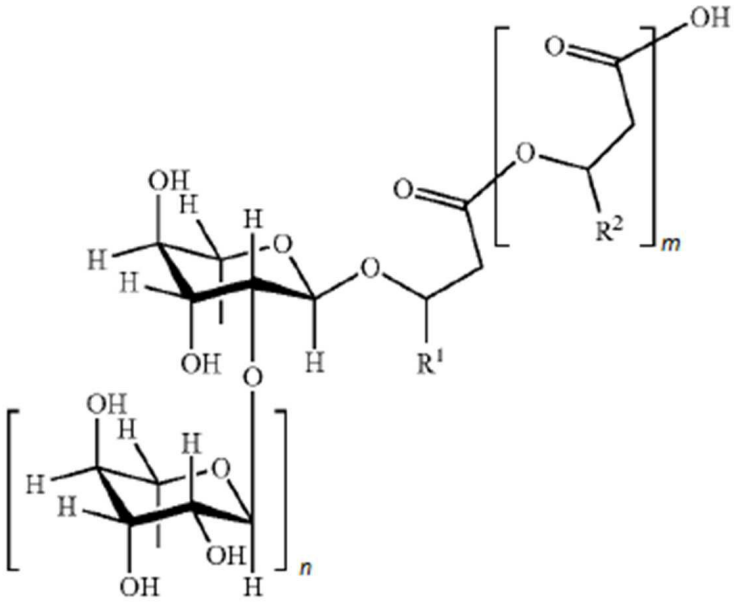
[0030] 본원에 정의 된 바와 같이, "미량 영양소 조성물"은 약 20 mg/L 이하의 양으로 존재하는 미량 영양소를 포함하는 조성물이다.

[0031] 용어 "배양 배지", "발효 배지"는 동의어이며 서로 교환하여 사용된다.

[0032] **발명의 상세한 설명**

[0033] 본원에서, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 복수의 발효 배지를 생산하기 위한 반-연속 발효 방법을 제공한다. 특정 실시 양태에서, 상기 람노리피드는 하기 구조 (I)을 가질 수 있다.

[0034] [구조 (I)]

[0035] 

[0036] 여기서, m = 2, 1 또는 0이고, 특히 1 또는 0이고, n = 1 또는 0, 또는 특히 1이고, R^1 및 R^2 = 각각 독립적으로 탄소수 2 내지 24, 바람직하게는 5 내지 13의 동일하거나 상이한 유기 라디칼이고, 특히 선택적으로 분지되고, 선택적으로 치환되고, 특히 히드록실-치환되고, 선택적으로 불포화되고, 특히 선택적으로 일-, 이- 또는 삼- 불포화된, 알킬 라디칼, 바람직하게는 펜테닐, 헵테닐, 노네닐, 운데세닐 및 트리데세닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이고, 및 $(CH_2)_o$-CH_3 (여기서, o는 1 내지 23, 바람직하게는 4 내지 12 임)이다.

[0037] 주쇄 및 분지쇄는 모두 N, O, S, Se 또는 Si와 같은 헤테로 원자를 더 함유 할 수 있거나, 또는 탄소 원자는 이들 헤테로 원자 중 하나에 의해 대체될 수 있다. 지방족 잔기는 하나 또는 그 이상의 관능기로 치환되거나 비치환될 수 있다. 치환체는 예를 들어, 이에 제한되지는 않으나, 아미노, 아미도, 카보닐, 카복실, 히드록실, 니트로, 티오 및 설포닐과 같은 임의의 작용기일 수 있다.

[0038] **람노리피드 생성 미생물**

[0039] 전술한 바와 같이, 상기 방법은 람노리피드 생산 미생물을 배양하는 단계를 포함한다. 람노리피드 생성 미생물은 람노리피드를 생산하는 숙주 세포일 수 있다. 람노리피드를 생산하는 재조합 숙주 세포가 숙주 세포일 수 있고, 예를 들어 RhlA 유전자 또는 그의 오쏘로그 및/또는 RhlB 유전자 또는 그의 오쏘로그 및/또는 RhlC 유전자 또는 그의 오쏘로그 및/또는 RhlR 유전자 또는 그의 오쏘로그, 및/또는 RhlI 유전자 또는 그의 오쏘로그, 및/또는 RhlG 유전자 또는 그의 오쏘로그 및 기타를 발현하는 박테리아 세포와 같은 숙주 세포일 수 있다.

[0040] 대안적으로, "람노리피드-생성 미생물"은 박테리아와 같은 임의의 미생물일 수 있으며, 이는 적절한 조건 하에서 람노리피드를 합성/생산하는 능력을 가지며, 여기에는 이에 제한되지 않으나, 필라 엑티노박테리아(Actinobacteria) 문, 퍼미큐테스(Fimicutes) 문, 및 프로테오박테리아(Proteobacteria) 문의 박테리아가 포함된다. 특정 실시 양태에서, 상기 람노리피드-생성 미생물은 감마프로테오박테리아(Gammaproteobacteria) 부류의 박테리아이다. 추가의 실시 양태에서, 람노리피드-생성 미생물은 슈도모나스 목(Pseudomonadales order)의 박테리아이다. 또 다른 추가의 실시 양태에서, 람노리피드-생성 미생물은 슈도모나딘(Pseudomonadacae) 과의 박테리아이다. 또 다른 구체 예에서, 람노리피드-생성 미생물은 P. 알칼리게네스(alcaligenes), P. 녹농균(aeruginosa), P. 클로라피스(chlororaphis), P. 클리멘시아(clemencia), P. 콜리에리아(collierea), P. 플루오레스센스(fluorescens), P. 루테올라(luteola), P. 퓨티다(putida), P. 스트투제리(stutzeri) 및 P. 티시디아(teessidea)와 같은 슈도모나스(Pseudomonas) 속에 속하는 박테리아이다. 추가의 실시 양태에서, 상기 람노리피드-생성 미생물은 P. 녹농균(aeruginosa)이다.

[0041] **배양 배지**

[0042] 상기 람노리피드 함유 미생물은 배양 배지에서 배양한다. 상기 배양 배지는 적어도 하나의 탄소원, 적어도 하나의 질소원, 적어도 하나의 인 공급원, 적어도 하나의 황원, 적어도 하나의 나트륨 공급원, 적어도 하나의 마그네슘 공급원, 적어도 하나의 칼륨 공급원, 적어도 하나의 황 공급원 및 적어도 하나의 염화물 공급원를 포함한다.

[0043] 상기 탄소 공급원은 예를 들어 글루코오스와 같은 모노사카라이드, 예컨대 수크로오스와 같은 디사카라이드, 예를 들어 글리세롤과 같은 당 알코올, 예를 들어 n-헥사데칸과 같은 장쇄 알칸, 예를 들어 카프릴 산(옥탄산이라고도 함)과 같은 지방산, 식물성 오일(신선 또는 폐기물; 예, 대두유) 또는 이들의 혼합물, 유기산(예: 젖산, 아세트산, 구연산, 프로피온산), 알콜(예: 에탄올) 및 이들의 혼합물을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 탄소 공급원은 올리브 오일, 유채 기름, 올리브 오일, 옥수수 유, 해바라기 유, 카놀라 유 및 대두유로 구성된 군에서 선택된 식물유이다. 상기 탄소 공급원은 약 6 % 내지 약 12 % w/w의 양으로 존재할 수 있다.

[0044] 상기 질소원(질소 공급원)은 황산 암모늄, 인산 암모늄, 우레아, 효모 추출물, 고기 추출물, 펩톤 및 옥수수 침지액일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 질소원은 $NaNO_3$이다. 또 다른 실시 양태에서, 상기 질소는 약 1-10 g/L의 양으로 존재할 수 있다.

[0045] 특정 구현예에서 상기 인 공급원은 H_3PO_4 또는 K_2HPO_4일 수 있다. 또 다른 특정 실시 양태에서, 상기 인은 약 1 내지 10 g/L의 양으로 존재한다.

[0046] 특정 구현 예에서 상기 마그네슘 이온은 $MgSO_4 * 7H_2O$ 및/또는 $MgCl_2$ 일 수 있다. 특정 구현 예에서, 상기 마그네슘은 약 0.01 내지 1 g/L의 양으로 존재한다.

[0047] 칼륨은 KCl 및/또는 KOH일 수 있다. 특정 구현 예에서, 상기 칼륨은 약 0.1 내지 약 2 g/L의 양으로 존재한다.

[0048] 상기 나트륨은 NaCl, $NaNO_3$ 및 NaOH일 수 있다. 특정 구현 예에서, 상기 나트륨 이온은 약 1 내지 15 g/L의 양으로 존재한다.

[0049] 상기 클로라이드(염화물)는 KCl 및 NaCl일 수 있다. 특정 구현 예에서, 상기 클로라이드 이온은 약 0.1-1 g/L의 양으로 존재한다.

[0050] 상기 황은 H_2SO_4일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 상기 황 이온은 약 0.1-1 g/L의 양으로 존재한다.

[0051] 상기 황, 염화물 및 질소 공급원은 수성층으로부터 유도될 수 있거나, 또는 출원 번호 제 14/992,995호에 기재된 절차를 사용하여 수득 할 수 있는, 산 처리되고 숙성된 미생물 함유 발효 배지의 수성 액상 또는 수성 상으로 지칭될 수 있다. 특정 구체 예에서, 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 발효 또는 배양 배지는 적어도 약 1일 동안 약 24 내지 72 시간 동안 약 0 내지 30 ℃에서 배양함으로써 숙성시킬 수 있다. 특정 구현 예에서, 상기 숙성된 수성 매질을 산으로 처리하여 상기 배양 배지를 약 1.5 내지 2.5, 바람직하게는 약 2.05 내지 약 2.15의 pH로 조정할 수 있다. 상기 산은 아세트산과 같은 유기산 또는 무기산일 수 있다. 바람직한 실시 양태에서, 상기 산은 무기산, 예를 들어 HCl, H_2SO_4, HNO_3 또는 H_3ClO_4이다. 그 결과, 수성 액상, 유상 및 고상이 생성된다. 상기 수성 액상은 당 업계에 공지된 절차 및 특정 구현 예에서 상기한 방법(예를 들어, 여과 또는 원심 분리 또는 디캔팅과 조합된 침강)을 사용하여 제거된다.

[0052] 상기 배양 배지는 유화제를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시 양태에서, 상기 유화제는 아라빅 검, 구아 검 및 람노리피드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 특정 실시 양태에서, 상기 배양 배지 중의 유화제 대 탄소원의 비율은 약 0.1% 내지 약 20% w/w이다. 또 다른 특정 실시 양태에서, 상기 유화제는 약 5 내지 10 중량%의 양으로 존재할 수 있다.

[0053] 특정 실시 양태에서, 상기 배양 또는 발효 배지는 당 업계에 공지된 방법을 사용하여 멸균된다. 이러한 방법은 여과 기반, 열 기반, 화학 기반 또는 자외선 방사 기반일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 열에 의한 처리는 습열 살균, 특히 고압 증기 멸균을 통한 것일 수 있다.

[0054] 한 실시 양태에서, 상기 수성 매질 (예를 들어, 발효 배지)은 상기 절차 중 하나에 의해 멸균될 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 상기 발효 배지는 상기 개시된 절차 중 둘 이상에 의해 멸균될 수 있으며, 이러한 멸균은 임의의 순서로 이루어질 수 있다. 그것은 발효의 첫 번째 사이클 동안 발효 배지에서 멸균될 수 있지만, 다음 사이클에서 또 다른 용기에서 멸균되어야 한다.

[0055] **미량 영양소 조성물(Micronutrient Composition)**

[0056] 전술한 바와 같이, 상기 방법은 미량 영양소 용액 또는 조성물을 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 미량 영양소는 Fe, Mn, Zn, Cu, Na의 극미량(trace)일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 상기 미량 영양소는 Fe, Mn, Zn, Na 또는 Cu 염이다. 보다 특정한 실시 양태에서, 상기 미량 영양소 조성물은 Fe, Mn, Zn, Na 및 Cu 염을 포함한다. 상기 조성물은 여과에 의해 멸균될 수 있다.

[0057] 특정 실시 양태에서, 상기 Cu 염은 $CuCl_2 * 2H_2O$ 및 $CuSO_4 * 5H_2O$ 중 적어도 하나이며, 미량 영양소 용액 약 0.5-3 g/L의 양으로 존재할 수 있고; 상기 Mn 염은 $MnSO_4 * H_2O$ 및 $MnCl_2 * 4H_2O$ 중 적어도 하나이며, 미량 영양소 용액의 약 0.1-1.5 g/L의 양으로 존재할 수 있고; 상기 Zn 염은 $ZnSO_4 * 7H_2O$ 또는 $ZnCl_2$이고, 미량 영양소 용액의 약 0.5-3 g/L의 양으로 존재할 수 있고; 상기 Fe 염은 $FeCl_3 * 6H_2O$ 또는 $FeSO_4$ 중 적어도 하나이며 미량 영양소 용액의 약 0.1-1 g/L의 양으로 존재할 수 있고; 상기 나트륨 염은 $Na_3C_6H_5O_7 * 2H_2O$이고 미량 영양 용액의 약 1 내지 5 g/L의 양으로 존재할 수 있다.

[0058] **특정 실시예의 설명**

[0059] **실시예 1: 배양 배지 제조**

[0060] 람노리피드 생산을 위한 녹농균(Pseudomonas aeruginosa) 발효용 배양 배지 중 8% 대두유의 조성을 하기 표 2에 나타내었다. 아라빅 검은 대두유의 10% w/w로 사용된다.

[0061] **표 2: 배양 배지 조성**

표 2

[0062]

구성	농도
아라빅 검	8.00 g/L
대두유(Soybean oil)	80.00 g/L
85%H_3PO_4	9.69 g/L
99%NaOH	5.21 g/L
99%$MgSO_4$*$7H_2O$	0.50 g/L
99%KCl	1.00 g/L
99%$NaNO_3$	15.00 g/L
98% H_2SO_4	0.92 g/L
탈이온수	나머지

[0063] 상기 배양 배지를 제조하기 위해, 먼저 아라빅 검을 탈이온수에 용해시켜 별도의 용기에서 150-250 rpm 및 40-45 ℃에서 교반하면서 5 % w/w 아라빅 검 용액을 얻는다. 이 단계는 모든 아라빅 검이 물에 녹을 수 있도록 적어도 30분이 소요된다. 둘째, 주방 믹서기와 같은 믹서기(블렌더)를 사용하여 탈 이온수로 대두유와 5% 아라빅 검 용액을 혼합한다. 잘 섞여 유화액이 얻어졌는지 확인한다(즉, 용액이 우유처럼 희게된다). 대두유의 유화액을 얻은 후, H_3PO_4를 상기 유화액에 첨가하여 교반하고, H_3PO_4가 잘 용해된 후, 다음 화학 물질 NaOH를 첨가한다. 다음 화학 물질은 $MgSO_4$,이어서 KCl, 다음 $NaNO_3$ 및 최종 H_2SO_4를 상기 유화액에 저어주면서 첨가한다. 다음 화학 물질을 첨가하기 전에 유화액에 잘 용해되었는지 확인한다. 이어서 상기 배양 배지를 증기 살균(고압 증기 멸균)할 수 있다.

[0064] **실시예 2: 미량 영양소 조성물 제조**

[0065] 미량 영양소의 조성을 하기 표 3에 나타내었다. 각 염의 농도는 미량 영양 용액의 g/L이다.

[0066] **표3: 미량 영양소의 조성**

표 3

[0067]

구성	농도
$Na_3C_6H_5O_7$ * $2H_2O$	2.00 g/L
$FeCl_3$ * $6H_2O$	0.3 g/L
$ZnSO_4$ * $7H_2O$	1.4 g/L
$CuCl_2$ * $2H_2O$	1.2 g/L
$CuSO_4$ * $5H_2O$	1.2 g/L
$MnSO_4$ * H_2O	0.8 g/L

[0068] 모든 화학 물질은 ACS 등급(가능한 가장 높은 순도)이다. $Na_3C_6H_5O_7$ * $2H_2O$를 먼저 교반을 통해 탈 이온수에 첨가한다. 모든 것이 용해 된 후에, $FeCl_3$ * $6H_2O$인 다음 화학 물질을 첨가할 수 있다. 이 단계는 표에 열거된 모든 화학 물질이 다음의 순서대로 첨가 될 때까지 반복되는데, 상기 순서는 $FeCl_3$ * $6H_2O$, 다음 $ZnSO_4$ * $7H_2O$, 다음 $CuCl_2$ * $2H_2O$, 다음 $CuSO_4$ * $5H_2O$ 및 최종 $MnSO_4$ * H_2O이다. 미량 영양소는 0.2 마이크론 멸균 여과를 사용하여 멸균될 수 있다. 상기 미량 영양소는 고압 증기 멸균하지 않는다.

[0069] **실시예 3: P. 녹농균(aeruginosa) (Schroeter) Migula (R4 균주)의 종자 배양**

[0070] ATCC # 55734로부터 얻은 R4 균주를 32℃에서 18 내지 24시간 동안 40 g/L TSA(Tryptic Soy Agar) 함유 한 한천 플레이트에 먼저 접종한다. R4 콜로니가 형성된 후, 단일 콜로니를 진탕 튜브, 37℃에서 20 내지 24시간 동안 20 g/L LB 브로스 (Lennox)의 5 ml로 배양한다. 최종 OD_{600}은 약 3-5이며, 상기 진탕 튜브의 LB 브로스 (Lennox) 용액은 황색에서 녹색으로 바뀐다. 그런 다음 진탕 튜브에서 얻은 R4 배양물을 1 % 접종에서 LB 브로스 (Lennox) 20 g/L를 함유하는 진탕 플라스크에 접종하고, 37℃에서 20-24 시간 동안 배양한다. 발효에 필요한

R4의 충분한 접종물을 생성하기 위해, 이 공정을 필요에 따라 반복한다. 상기 LB 브로스 (Lennox)는 10 g/L 트립톤, 5 g/L 효모 추출물 및 5 g/L NaCl을 함유한 Sigma Aldrich # 3022에서 얻는다.

[0071] **실시예 4: 탈 이온수 및 10 % w/w의 아라빅 검(유화제로서) 대 대두유를 사용한 람노리피드의 반-연속 발효**

[0072] ATCC# 55734(R4)에서 얻은 P. 녹농균(aeruginosa) (Schroeter) Migula의 발효는 10L 생물 반응기에서 수행되며, 도 1에 개략적으로 설명되어 있다. 이는 상기 발효기 10에서 아라빅 검 대 대두유 10% w/w 및 8% 대두유의 배양 배지의 8L 제조로 시작된다. 상기 실시예 1에서 상기 배양 배지에 사용된 화학 물질은 ACS 등급(가능한 최고의 순도)이다. 상기 배양 배지를 멸균한 후, 물 가열 재킷을 사용하여 온도를 37℃로 낮추고 교반(250 rpm)을 시작한다. 일단 온도가 37℃에서 안정하면, 0.2 미크론의 여과된 공기가 1.5 L/분의 폭기 라인(# 4)을 통해 상기 발효기에 공급되고, 상기 발효기는 라인 #1을 통해, 실시예 3에서 얻은 R4의 2.5 %(200 ml) 접종 물로 접종시킨다. 이어서, 실시예 2에서 제조된 여과 멸균 된 8 ml 미량 영양소를 1 일 1 회 라인 # 2를 통해 상기 발효기에 첨가한다. 상기 미량 영양소를 매일 첨가 할 수 없는 경우, 8 ml의 미량 영양소를 32 ml의 탈 이온수(하루당)에 희석하여 상기 발효기에서 연축 펌프를 사용하여 40 ml/일의 속도로 연속적으로 첨가한다. 실리콘 기반의 소포제(Sigma Aldrich # 85390)가 #3 라인을 통해 발효 중 거품을 녹이기 위해 자동으로 첨가된다.

[0073] 상기 발효는 발효 과정 동안 pH 조절이 없는 6.2의 배양 배지의 초기 pH로 37 ℃의 온도에서 수행된다. 상기 교반 속도는 용해된 산소 % (% DO)를 15 % -20 %로 유지하기 위해 필요에 따라 교반 속도가 자동 증가한다. 상기 교반 속도는 성장 속도 동안 미생물의 산소 요구량을 맞추기 위해 접종 후 40-48 시간에 공기 유량이 1.5에서 3.5 L/min로 증가하기 전에 교반 속도가 500 rpm으로 올라간다. 접종 후 60 시간 후에, 상기 pH는 약간 떨어진 후, 증가한다(또는 안정을 유지한다). 또한, 상기 %DO는 상기 교반 및 공기 흐름이 가장 낮은 값(250 rpm 및 1.5 L/분)인 동안, 증가하고, 이는 상기 발효가 발효가 72 시간에 완료되었음을 나타낸다. 이것은 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 발효 배지의 잔류 대두유가 0.8 % 미만인 것으로 확인될 수 있다.

[0074] 그런 다음, 상기 연동 펌프를 작동시켜 라인 # 5를 통해 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 상기 발효 배지의 6 L(전체의 75 %)를 제거한다. 소위 "취출(Draw) # 1"이라고 불리는 6L의 배지가 제거되면, 멸균 탱크(20)에서 제조된 최근 멸균 8 % 대두유 배양 배지의 6L가 상기 발효기(10)로 중력 공급방식을 사용하여 공급된다. 초기 발효 배지 pH는 6.5이다. 위의 단락에서 설명한 발효 매개 변수가 사용된다. 이 경우, 48 시간 후, 상기 발효가 완료되고 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 발효 배지의 75%가 인출 준비가 된다(취출(Draw) # 2). 이어서, 멸균된 대두유 배양 배지의 다음 배치를 멸균 탱크(20)로부터 공급 받는다. 발효기가 세척을 위해 셧다운되기 전에 람노리피드 수율 및 역가의 손실의 징후가 없는 과정이 6 주 동안 반복된다. 각 취출(Draw) 동안 및 각 취출 사이의 발효 중의 pH 변화를 도 2에 나타냈다. 상기 람노리피드(RL) 농도 및 역가를 하기 표 4에 나타내었다. 12 개의 모든 취출액 중 람노리피드(RL) 농도는 최소 62 g/L에서 최대 79 g/L이다. RL 생산성(역가, 역가)은 0.92-1.61 g/L/h이다.

[0075] **표 4: 대두유로 반-연속 발효 중의 람노리피드 농도 및 역가(Titer)**

표 4

[0076]

취출#	초기 대두유 (%)	발효 시간 (추출 사이의) (h)	총 RL (g/L)	역가 RL (g/L)	미량 영양소
1	8.0%	72	66	0.92	
2	6.0%	48	62	1.29	
3	6.0%	46	71	1.54	연속 첨가
4	7.5%	69	77	1.12	
5	6.0%	46	74	1.61	
6	6.0%	48	74	1.54	
7	7.5%	71	79	1.11	일일 첨가
8	6.0%	47	70	1.49	
9	6.0%	46	66	1.43	
10	7.5%	69	65	0.94	
11	6.0%	48	68	1.42	연속 첨가
12	6.0%	48	69	1.44	

[0077] **실시예 5: 미량 영양소 연속 첨가로 아라빅 검 대 대두유 5% w/w, 탈이온수로의 람노리피드의 반연속 발효**

[0078] 하기 표 5에서 사용된 배양 배지의 조성, 즉, 5 % (w / w) 아라빅 검 대 대두유의 비로 8% 대두유의 7.3L는 실시예 1에서 기술 된 바와 같이 제조하였다. 이 실시예에서 사용된 모든 화학 물질은 불순물을 함유하는 산업용 등급이다.

[0079] **표 5: w/5% 아라빅 검, 8% 대두유 및 5% R4 접종물 배양 배지의 조성**

표 5

[0080]

구성	농도
아라빅 검	4.00 g/L
대두유(Soybean oil)	80.00 g/L
85%H_3PO_4	9.69 g/L
99%NaOH	5.21 g/L
99%$MgSO_4*7H_2O$	0.50 g/L
99%KCl	1.00 g/L
99%$NaNO_3$	15.00 g/L
98% H_2SO_4	0.92 g/L
탈이온수	나머지

[0081] 발효는 5 % (360 ml)의 R4 접종물을 제외하고, 실시예4에서와 같이 수행하였다. 상기 접종물은 발효기를 접종하는데 사용되었고, 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 함유하는 배양 배지의 77%(5.6 L)를 취출하고, 새로운 배양 배지는 아라빅 검 대 대두유 5% w/w를 함유한다. 미량 영양소는 실시예 2에서 기술한 바와 같이 제조한다. 32.7 ml 탈 이온수에 미량 영양소 7.3 ml를 희석하는 것으로부터(하루당), 이를 연동 펌프를 사용하여 40 ml/하루의 유속으로 연속적으로 첨가한다. 실리콘 기반 소포제(DOW AFE-1510)가 발효 중에 거품을 녹이기 위해 자동으로 추가된다. 교반 속도는 1.5L/분의 공기 유량으로 % 용존 산소(% DO)를 15% - 20%로 유지하기 위해 필요한 경우, 교반 속도가 자동으로 증가한다. 교반을 억제하여 발포 문제를 줄이기 위해, 순수 산소를 0.005 - 0.1 L/분으로 발효기에 추가로 첨가한다. 접종 후 발효 과정 또는 새로운 배양 배지로 충전 한 후의 pH의 전형적인 변화를 도 3에 나타내었다. 람노리피드(RL) 농도 및 역가를 하기 표 6에 나타내었다.

[0082] **표 6: 5% R4 접종물을 사용하는 반-연속 방법을 사용한, 람노리피드 농도 및 역가**

표 6

[0083]

취출#	초기 대두유 (%)	발효 시간 (추출 사이의) (h)	총 RL (g/L)	역가 RL (g/L)
1	8.0%	59	56	0.90
2	7.7%	70	79	1.13
3	6.1%	65	76	1.17
4	8.0%	96	70	0.73
5	7.7%	91	76	0.84
6	8.0%	82	70	0.85
7	7.7%	70	78	1.11

[0084] **실시예 6: 2X의 미량 영양소 연속 첨가와 5% w/w 아라빅 검 대 대두유, 탈이온수로의 람노리피드의 반연속 발효**

[0085] 이 실시예에서, 배양 배지 및 발효 파라미터는 사용된 미량 영양소의 양이 2 배인 것을 제외하고는 실시예 5에서 나타낸 것과 동일하다. 26.4 ml의 탈 이온수에서 14.6 ml의 미량 영양소(실시예 2에서 제조됨)를 희석시킴으로써(하루당),이를 연축 펌프를 사용하여 40 ml/하루의 유속으로 연속적으로 첨가하였다. 1.5L/분의 공기 유량으로 % 용존 산소 (% DO)를 15 % - 20 %로 유지하기 위해 필요한 경우 교반 속도가 자동으로 증가한다. 교반 속도를 낮추고 발포 문제를 줄이기 위해 순수한 산소를 공기 흐름의 10-30 %에서 발효기에 추가로 첨가하여 총 유속을 1.5 L/분으로 일정하게 유지한다. 람노리피드(RL) 농도 및 역가를 하기 표 7에 나타내었다.

[0086] **표 7: 2X 미량 영양소로 반연속 발효 중, RL 농도 및 역가**

표 7

[0087]

취출#	초기 대두유 (%)	발효 시간 (추출 사이의) (h)	총 RL (g/L)	역가 RL (g/L)
1	7.7%	73	75	1.03
2	6.1%	48	64	1.33
3	7.7%	68	69	1.01
4	6.1%	69	66	0.96

[0088] **실시예 7: 하나 또는 그 이상의 람노리피드를 포함하는 발효 배지로부터의 8% 대두유 및 85% 냉 수돗물/15% 수용성 상층 폐기물 스트림을 이용한 람노리피드의 반연속 발효**

[0089] 본 실시예에 사용된 배양 배지의 조성을 하기 표 8에 나타낸다.

[0090] **표 8: 수층을 갖는 배양 배지**

표 8

[0091]

구성	농도
대두유(Soybean oil)	80.00 g/L
85%H_3PO_4	9.69 g/L
99%NaOH	5.21 g/L
99%$MgSO_4*7H_2O$	0.50 g/L
99%KCl	1.00 g/L
99%$NaNO_3$	15.00 g/L
수층 폐수	150.00 g/L
냉 수돗물	나머지

[0092] 상기 수성 최상층 폐기물 스트림은 2016 년 1 월 11 일자 미국 특허 출원 제 14992995 호(상기 출원의 실시예 3 참조)에 기재된 방법을 사용하여 수득할 수 있다. 요약하면, 수성 최상층 폐기물 스트림은 정화된 발효 브로스로부터 얻어진다. 정화된 브로스는 pH 6.0 내지 6.5에서 끝나는, P. 녹농균(aeroginosa) 함유 발효 배지를 주변 조건 하에서 약 2 일 동안 숙성시킴으로써 만들어진다. 바이오 매스는이 노화 과정에 사용된 용기의 바닥에 침전되고, 제거된 후 맑은 상등액은 정화된 브로스가 된다. 이 공정의 다음 단계는 pH가 약 2.1이 될 때까지 진한 황산과 같은 산을 첨가하는 것이다. 람노리피드는 용액으로부터 침전되어 이 단계에서 사용되는 용기의 바닥에 고체상 및 유성 액체상을 형성한다. 고형 및 유성 액체상의 분리는 원심 분리에 의해 촉진될 수 있다. 고형 및 유성 액체상은 폐기되거나 재순환 될 수 있는 수성 상층 또는 층으로부터 분리된다. 상기 참조된 수성층은 H_2SO_4의 공급원이며, 차가운 수돗물의 잔부에 8 % 대두유가 함유된 배지에서 15 % w/w가 사용되는 미량 영양소가 존재한다. 상기 폐기물 스트림 수성 상층은 먼저 사용 전에 큰 입자를 제거하기 위해 1 마이크론에서 여과된다.

[0093] 15 % 폐기물 스트림 상부 수층 및 냉각 수돗물을 갖는 8 % 대두유를 함유하는 7.3 L의 배양 배지는 먼저 주방 블렌더를 사용하여 대두유, 수성 상층 및 차가운 수돗물을 혼합함으로써 제조된다. 이들 모두가 잘 혼합 된 후, H_3PO_4, NaOH, $MgSO_4$, KCl 및 $NaNO_3$가 교반하에 이 순서로 용액에 첨가된다. 이어서 배양 배지를 증기 살균(고압 멸균)할 수 있다. 이 예에서 사용된 모든 화학 물질은 불순물이 함유된 산업용 등급이다.

[0094] 발효는 실시예 5와 동일한 파라미터로 수행하였다. 미량 영양소 조성물을 연속적으로 첨가하였다. 교반 속도를 낮추고 발포 문제를 줄이기 위해, 순수한 산소를 공기 흐름의 10-30 %에서 발효기에 추가로 첨가하여 총 유속을 1.5 L/분으로 일정하게 유지한다. 람포리드 (RL) 농도 및 역가를 하기 표 9에 나타내었다.

[0095] **표 9: 반연속 발효 중, RL 농도 및 역가**

[0096] **(수층)**

표 9

[0097]

취출#	초기 대두유 (%)	발효 시간 (추출 사이의) (h)	총 RL (g/L)	역가 RL (g/L)
1	8.0%	95	74	0.78
2	6.1%	75	64	0.85
3	7.7%	92	73	0.79
4	6.1%	60	62	1.03
5	7.7%	83	71	0.85
6	6.1%	71	68	0.96
7	7.7%	89	77	0.86

[0098] **실시예 9: 100L 스케일에서 람노리피드의 반연속 발효**

[0099] 100 L의 배양 배지(실시예 5에서와 같은 조성)를 실시예 1에서와 같이 제조하고 120 L의 생물 반응기에서 멸균시켰다. 그 조성을 하기 표 10에 나타내었다. R4 균주의 종자 배양액을 실시예 2에 따라 제조하였다. 100L 발효기에 20 g/L LB 브로스 레녹스 중 37 ℃에서 24 시간 동안 진탕 플라스크에서 배양 된 2.9L R4 균주를 접종하였다.

[0100] 발효는 발효 과정 동안 pH 조절이 없는 6.2의 배양 배지의 초기 pH로 37 ℃의 온도에서 수행된다. 실리콘 기반 소포제(DOW AFE-1510)를 50% 탈 이온수로 희석 한 다음 사용 전에 고압멸균한다. 소포제가 발효 중에 거품을 녹이기 위해 자동으로 첨가된다. 교반은 공기를 17 L/min로하여 150 rpm으로 교반한다. 용해된 산소 % (% DO)를 15 % - 20 %로 유지하기 위해 필요에 따라 교반 속도가 자동으로 증가한다. 제조된 미량 영양소 800 ml 및 실시예 2의 조성물을 탈 이온수 2.2 L로 희석하여 375 ml/일에서 8 일 동안 연속적으로 공급하였다.

[0101] 실시예 1에서와 같이 9 % 대두유(하기 표 10의 조성물)를 함유하는 배양 배지 70 L를 제조하고, 취출(Draw)하기 하루 전에 상이한 100 L 생물 반응기에서 멸균시킨다. 접종 105 시간 후에, pH는 약 7로 일정하게 유지된 후에 증가하기 시작한다. 발효는 pH가 7.3 인 115 시간에서 완료된다.

[0102] **표 10: 9% 대두유 배양배지(70L)의 조성**

표 10

[0103]

구성	농도
아라빅 검	4.50 g/L
대두유(Soybean oil)	90.00 g/L
85%H_3PO_4	9.69 g/L
99%NaOH	5.21 g/L
99%$MgSO_4*7H_2O$	0.50 g/L
99%KCl	1.00 g/L
99%$NaNO_3$	15.00 g/L
98%H_2SO_4	0.92 g/L
탈이온수	나머지

[0104] 접종 후 115 시간 후에, 연동 펌프를 작동시켜 하나 이상의 람노리피드를 포함하는 발효 배지 70 L(총양의 70 %)을 제거한다. 일단 "취출 # 1"이라 불리는 70L의 배지가 제거되면, 최근 멸균된 70 % 대두유 배양 배지가 연축 펌프를 사용하여 발효기에 공급된다. 초기 발효 pH는 6.5이다. 위의 단락에서 설명한 발효 매개 변수가 사용된다. 이 경우, 70 시간 후에, pH 7.14로 발효가 완료된다. 람노리피드 (RL) 농도 및 역가를 하기 표 11에 나타내었다.

[0105] **표 11: RL 농도 및 역가(100L 스케일)**

표 11

[0106]

취출#	초기 대두유 (%)	발효 시간 (추출 사이의) (h)	총 RL (g/L)	역가 RL (g/L)
1	8%	115	70	0.61
2	6.3%	70	75	1.07

[0107] **실시예 9: 미량 영양소 없이 진탕 플라스크 실험**

[0108] 250 ml 쉐이크 플라스크에서 실시예 1과 같이, 배양 배지 50 ml(조성은 하기에 나타냄)를 제조한다. 그 조성은 하기 표 12에 나타내었다. 고압멸균한 후 실온으로 냉각시킨 후, 진탕 플라스크에 R4 균주의 5 % 냉동 스톡을 접종한다. 상기 냉동 스톡은 30%의 글리세롤과 3-4의 OD600을 가지는 70 % R4 튜브 배양물을 혼합하여 수득되고, -80 ℃에서 보관된다. 배양은 미량 영양소를 첨가하지 않고 진탕기에서 37 ℃에서 92 시간 동안 수행한다. 접종 92 시간 후, 람노리피드 농도는 5 개의 진탕 플라스크에 대해 평균 47 ± 3 g/L이다.

[0109] **표 12: 미량 영양소 없이 발효에 사용하기 위한 배양 배지 농도**

표 12

[0110]

구성	농도
아라빅 검	6.00 g/L
대두유(Soybean oil)	60.00 g/L
85%H_3PO_4	9.69 g/L
99%NaOH	5.21 g/L
99%$MgSO_4*7H_2O$	0.50 g/L
99%KCl	1.00 g/L
99%$NaNO_3$	15.00 g/L
98%H_2SO_4	0.92 g/L
탈이온수	나머지

[0111] 참조문헌:

[0112] [1] Randhawa et al. (2014) “Rhamnolipid biosurfactants?past, present, and future scenario of global market”, Frontiers in Microbiology 5:1-7.

[0113] [2] Muller et al. (2012) “Rhamnolipids?Next generation surfactants?”, J Biotechnol 162(4):366-80.

[0114] [3] Banat et al. (2010) “Microbial biosurfactants production, applications and future potential” Appl. Microbiol. Biotechnol. 87:427-444.

[0115] [4] Wang et al (2007) “Engineering Bacteria for Production of Rhamnolipid as an Agent for Enhanced Oil Recovery” Biotech. and Bioeng. 98: 842-853.

[0116] [5] Wittgens et al. (2011) “Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic Pseudomonas putida KT2440” Microbial Cell Factories 10: 80-98.

[0117] [6] Nitschke et al (2011) “Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on Pseudomonas-derived molecules of increasing industrial interest” Proc Biochem 46: 621?630.

[0118] [7] Gong et al (2015) “Rhamnolipid production, characterization and fermentation scale-up by Pseudomonas aeruginosa with plant oils” Biotechnol Lett 37: 2033-2038.

[0119] [8] Giani et al (1997) “Pseudomonas Aeruginosa and its use in a process for the biotechnological preparation of L-rhamnose” US Patents#5,658,973.

[0120] [9] Mcneil and Harvey (2008) “Practical fermentation technology” John Wiley & Sons Ltd, England.

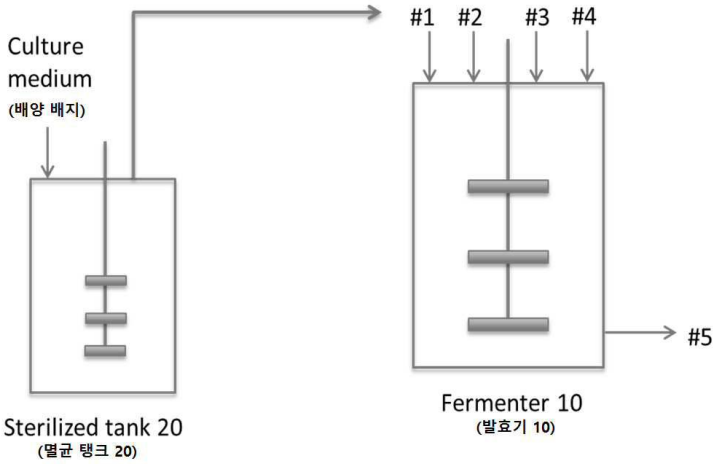
[0121] [10] Zhu et al (2012) "Enhanced rhamnolipids production by Pseudomonas aeruginosa based on a pH stage-controlled fed-batch fermentation process, Bioresource Technology 117: 208?213.

[0122] [11] Ghomi et al (2012) "Comparison between batch and fed-batch production of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa" Iranian J Biotech 10: 263-269.

[0123] [12] Camilios et al (2009) "Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: characterization downstream processing and application in the cleaning of contaminated soil" Biotechnol J 4: 748-755.

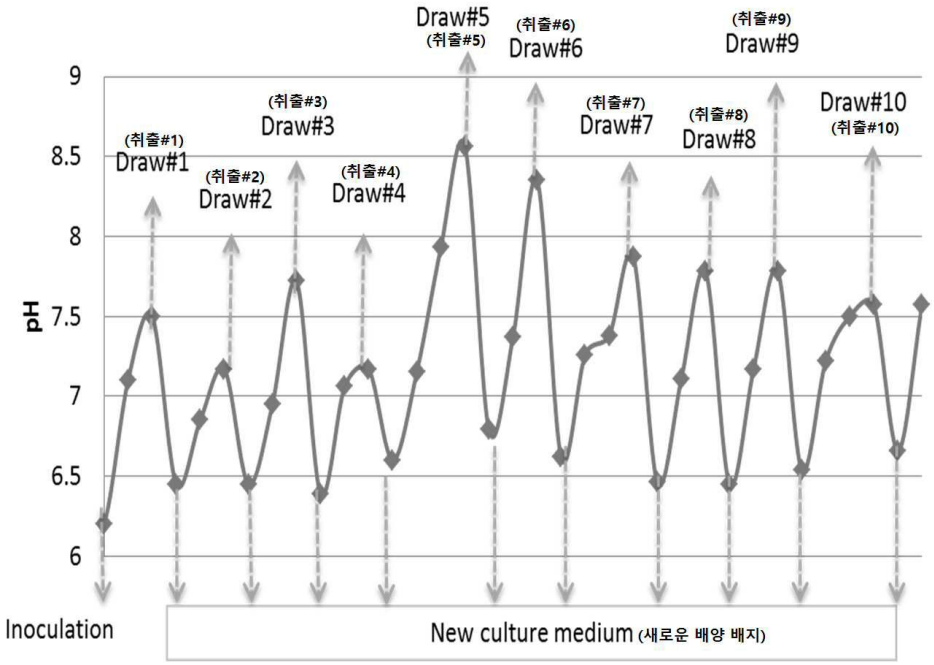
도면

도면1

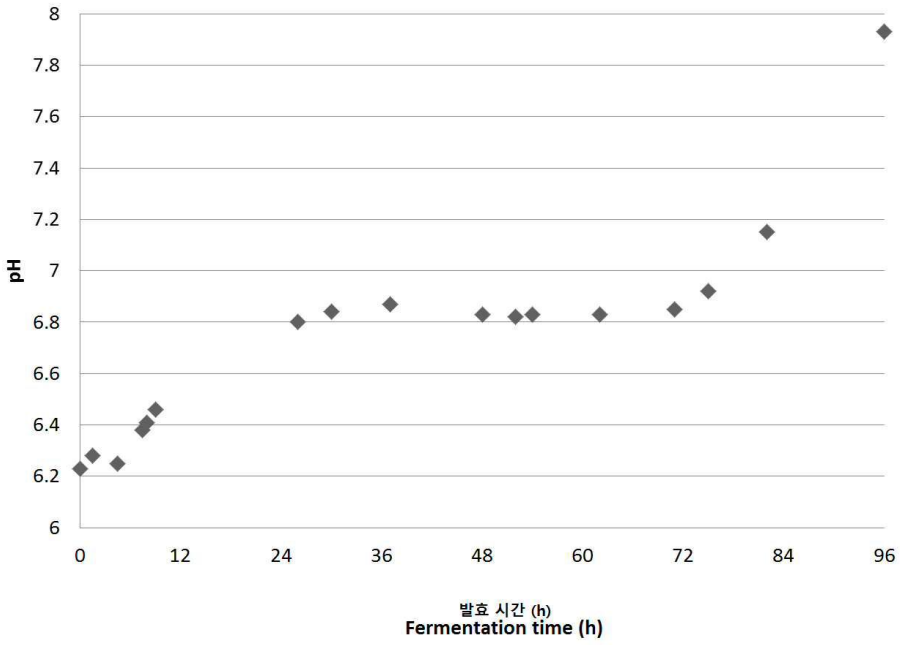


라인#	Input	Output
1	Inoculum (접종)	
1	멸균 배양 배지	
2	Micronutrient (미량 영양소)	
3	Antifoam (소포제)	
4	공기 및/또는 산소(O_2)	
5		발효 브로스

도면2



도면3


8
7.8
7.6
7.4
7.2
7
6.8
6.6
6.4
6.2
6
pH
0
12
24
36
48
60
72
84
96
발효 시간 (h)
Fermentation time (h)