(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 1 월 17 일 (17.01.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/013493 A2

(51) 국제특허분류:
C12P 19/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/007663

(22) 국제출원일: 2018 년 7 월 5 일 (05.07.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0089133 2017 년 7 월 13 일 (13.07.2017) KR

(71) 출원인: (주)카보엑스퍼트 **(CABOEXPERT INC.)** [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99, 충남대학교 농생대 3호관 3208호, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **이창규 (LEE, Chang Kyu)**; 34209 대전시 유성구 학하남로 10, 210동 1904호, Daejeon (KR). **곽지윤 (KWAK, Ji Yun)**; 30127 세종시 새롬남로 102, 1208동 2005호, Sejong (KR). **유민지 (YOU, Min Jee)**; 34401 대전시 대덕구 동춘당로114번길 60, 303동 801호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (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.

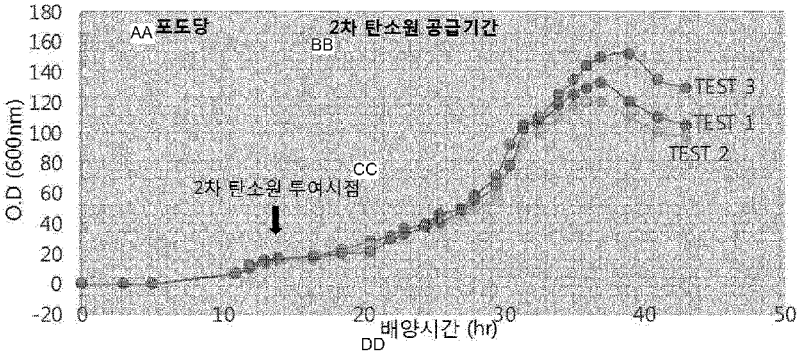
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYSACCHARIDE USING HIGH-CONCENRATION CELL CULTURE METHOD

(54) 발명의 명칭: 고농도 세포 배양 방법을 이용한 다당체의 생산 방법



AA ... Glucose
BB ... Period of supplying secondary carbon source
CC ... Point of introducing secondary carbon source
DD ... Culture time (hr)

(57) Abstract: The present invention relates to a polysaccharide production method including the steps of: 1) culturing *Escherchia coli* variant strain TBP38 in a culture medium including glucose as a primary carbon source; 2) adding a secondary carbon source to the culture medium from step 1), and then culturing for 20-30 hours and obtaining cultured cells; and 3) extracting polysaccharide from the cultured cells obtained in step 2). The method according to the present invention can be used to increase the productivity of useful polysaccharides.

(57) 요약서: 본 발명은 1) 대장균(*Escherchia coli*) 변이체 TBP38 균주를 1차 탄소원으로 글루코오스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 2) 상기 단계 1)의 배양액에 2차 탄소원을 첨가한 후 20~30시간 동안 배양하고 배양된 균체를 획득하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)에서 획득한 배양된 균체로부터 다당체를 추출하는 단계를 포함하는 다당체의 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법은 유용한 다당체의 생산성을 증대시키는데 이용될 수 있다.

WO 2019/013493 A2

명세서

발명의 명칭: 고농도 세포 배양 방법을 이용한 다당체의 생산 방법

기술분야

[1] 본 발명은 고농도 세포 배양 방법을 이용한 다당체의 생산 방법에 관한 것이다.

[2] 본 발명은 중소기업청에서 지원한 혁신형기술개발사업(S2497548)으로 수행된 연구결과입니다.

배경기술

[3] 현재까지 생산되는 다당체는 통상적으로 보리, 인삼, 쑥, 은행 등의 식물과 클로렐라 및 일부 해조류로부터 추출되고 있으며, 현재 사용되고 있는 대부분의 다당체는 식용 또는 약용버섯으로부터 추출하여 제품화한 것으로, 다당체를 추출하는 방식은 자실체나 균사체를 열수 추출하여 얻어지는 것인데, 이러한 기술적인 방식은 자실체 생산의 한계로 인한 원료 수급의 문제와 균사체에서 다당체를 추출할 경우 많은 양을 얻을 수 없는 단점이 있다. 더구나 인공배양이 되지 않는 몇몇 버섯의 경우는 자실체로부터 다당체의 대량생산 자체가 거의 불가능한 실정이다.

[4] 유용한 물질의 생물학적 생산방법 중 미생물을 이용하여 생산하는 방법으로 회분식, 연속식, 유가식 등의 방법이 알려져 있다. 이들 방법을 서로 비교해 보면, 회분식 배양(batch culture) 방법은 연속식에 비하여 생산성이 낮은 단점이 있으며, 반면 연속식 배양(continuous culture) 방법은 배양시간이 길기 때문에 균체가 오염될 가능성이 높고 설비 투자비가 고액인 단점이 있어서 산업적으로 이용하기가 어려운 단점이 있다. 이에 비해, 유가식 배양(fed batch) 방법은 회분식 배양 방법에 비해 생산성을 높일 수가 있고 연속식에 비해 쉽게 산업화시킬 수 있는 장점이 있어, 최근 유가식 배양에 대한 연구 및 산업화 시도가 많이 이루어지고 있다.

[5] 한편, 미생물의 균체 자체를 최종 생산물로 획득하기 위한 발효공정에 있어서 균체의 함량을 증대시킬수록 유리하지만, 발효조에서의 균체의 함량을 최대한으로 증가시키는데는 일정한 한계가 있다. 즉, 이론적으로 일정 함량(70~80%) 이상의 미생물의 균체로만 발효조를 채울 경우, 미생물의 종류에 따라 차이는 있지만 대략 240~280g/L를 최대 한계로 보고 있다. 그러나 실제로 미생물을 배양하는 데에는 영양소가 적절히 공급되어야 하고 어느 정도의 균체량이 되면 물질 전달이 불가능하며 생육이 정지 상태가 되기 때문에 결국 배양가능한 농도는 그 이하가 된다.

[6] 이에, 최근에는 발효공정에 있어서 생산성을 증대시키기 위한 방법의 하나로 고농도 세포 배양 기술이 연구되고 있는 바, 고농도 세포 배양 기술은 일정 농도의 균체가 생육을 계속할 수 있도록 배양 조건을 최적화시키면서 최대의 균체를 얻는 기술이다. 이러한 고농도 세포 배양 방법은 특히 유용한 물질을

생산하는 균체를 대량 생산하는데 매우 유용한 것으로 그 이용가치가 매우 뛰어나다고 할 수 있다.

[7] 한편, 한국공개특허 제2005-0024730호는 'T-20 펩타이드 코딩 유전자를 포함하는 재조합 대장균의 고농도 세포 배양 방법 및 이로부터 생산된 T-20 펩타이드의 분리 및 정제 방법'을 개시하고 있으며, 한국공개특허 제2001-0010192호는 '영지버섯 세포외 다당체의 생산방법'을 개시하고 있으나, 본 발명의 고농도 세포 배양 방법을 이용한 다당체의 생산 방법에 대해 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 대장균(*Escherchia coli*) 변이체 TBP38 균주로부터 다당체를 대량생산하기 위해 본 배양(main culture)시 2차 공급용 탄소원으로, 글루코오스, 말토오스 또는 옥수수전분 당화액을 첨가하고 탄소원 별로 TBP38 균주의 생장 및 균체 회수 중량을 측정한 결과, 글루코오스 및 말토오스를 사용한 경우보다 옥수수전분 당화액을 사용하여 배양하였을 때, TBP38 균주의 생장 및 균체 회수 중량이 현저하게 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 고온고압처리 방법을 이용하여 상기 균체로부터 다당체를 추출하였을 때, 통상적으로 사용되는 초음파 처리 방법보다 회수량이 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[9] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 1) 대장균(*Escherchia coli*) 변이체 TBP38 균주를 1차 탄소원으로 글루코오스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 2) 상기 단계 1)의 배양액에 2차 탄소원을 첨가한 후 20~30시간 동안 배양하고 배양된 균체를 획득하는 단계; 및 3) 상기 단계 2)에서 획득한 배양된 균체로부터 다당체를 추출하는 단계를 포함하는 다당체의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[10] 본 발명에 따르면, 옥수수전분 당화액을 2차 탄소원으로 제공할 경우 대장균(*Escherchia coli*) 변이체 TBP38 균주의 균체 증식과 더불어 균체 내 다당체 축적이 향상되며, 고온고압 처리 방법을 이용한 다당체의 회수방법이 기존 초음파 처리 방법에 비해 다당체 회수율이 우수하므로, 본 발명의 방법은 유용한 다당체의 생산성을 증대시키는데 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[11] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 옥수수전분 당화액에 대한 고성능 음이온 교환 크로마토그래피 분석 결과이다.

[12] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 대장균(*Escherchia* coli) 변이체 TBP38 균주의 배양 과정을 나타낸 모식도이다.

[13] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 2차 공급용 탄소원으로 글루코오스(TEST

1), 말토오스(TEST 2) 및 옥수수전분 당화액 분말(TEST 3)을 각각 사용하였을 때, 대장균 변이체 TBP38 균주의 생장곡선을 나타낸 것이다.

[14] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 대장균 변이체 TBP38 균체로부터 다당체를 추출하기 위한 초음파 처리 방법 및 고온고압처리 방법에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[15] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[16] 1) 대장균(*Escherchia* coli) 변이체 TBP38 균주를 1차 탄소원으로 글루코오스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;

[17] 2) 상기 단계 1)의 배양액에 2차 탄소원을 첨가한 후 20~30시간 동안 배양하고 배양된 균체를 획득하는 단계; 및

[18] 3) 상기 단계 2)에서 획득한 배양된 균체로부터 다당체를 추출하는 단계를 포함하는 다당체의 생산 방법을 제공한다.

[19] 본 발명의 대장균(*Escherchia* coli) 변이체 TBP38 균주는 계대배양(subculture), 종균배양-1(seed culture-1), 종균배양-2(seed cultrue-2) 및 본 배양(main culture)까지 총 4단계의 과정을 거쳐 배양을 실시하게 되며, 상기 단계 1) 및 단계 2)에 기재된 내용은 본 배양(main culture)의 과정에 관한 것이다.

[20] 본 발명의 일 구현 예에 따른 다당체의 생산 방법에서, 상기 단계 1)의 대장균(*Escherchia* coli) 변이체 TBP38 균주는 포도당(=글루코오스)을 단위체로 한 알파-1,4 글루코시드 결합 및 알파-1,6 글루코시드 결합으로 이루어진 다당체를 생산하는 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[21] 본 발명의 일 구현 예에 따른 다당체의 생산 방법에서, 상기 단계 1)의 1차 탄소원으로 글루코오스를 포함하는 배지는 1~3g/L $(NH_4)_2 \cdot HPO_4$, 6~9g/L KH_2PO_4, 0.5~1.5g/L 시트르산, 0.5~1g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15~25g/L 글루코오스 및 미량 금속 용액을 포함하는 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[22] 또한, 상기 단계 2)의 옥수수전분 당화액 분말은 상기 단계 1)의 균주 배양액의 O.D값이 8.0~20일 때 첨가하는 것일 수 있고, 바람직하게는 단계 1)의 균주 배양액의 O.D값이 10일 때 첨가하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[23] 또한, 상기 단계 2)의 2차 탄소원은 글루코오스(glucose), 말토오스(maltose), 말토트리오스(maltotriose), 말토테트라오스(maltotetraose), 말토펜파오스(maltopentaose) 및 말토헥사오스(maltohexaose)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[24] 또한, 상기 2차 탄소원은 옥수수전분 당화액 분말일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[25] 또한, 상기 옥수수전분 당화액 분말은,

[26] (a) 아세트산나트륨(sodium acetate) 완충용액에 옥수수전분을 첨가하여 옥수수전분 호화액을 제조하는 단계;

[27] (b) 상기 단계 (a)의 옥수수전분 호화액에 펑가밀(fungamyl) 및 프로모자임(promozyme)을 첨가한 후 반응시켜 옥수수전분 당화액을 제조하는 단계;

[28] (c) 상기 단계 (b)의 옥수수전분 당화액을 열처리하여 반응을 종료시키는 단계; 및

[29] (d) 상기 단계 (c)에서 반응을 종료시킨 옥수수전분 당화액을 동결건조하여 분말화하는 단계를 포함하여 제조될 수 있으며, 바람직하게는

[30] (a) pH 4.0~5.4 및 30~70mM의 아세트산나트륨(sodium acetate) 완충용액 100 중량부에 대하여 15~45 중량부의 옥수수전분을 첨가하여 옥수수전분 호화액을 제조하는 단계;

[31] (b) 상기 단계 (a)의 옥수수전분 호화액 100 중량부에 대하여 0.5~1.5 중량부의 펑가밀(fungamyl) 및 0.5~1.5 중량부의 프로모자임(promozyme)을 첨가하여 50~65℃에서 20~28시간 동안 반응시켜 옥수수전분 당화액을 제조하는 단계;

[32] (c) 상기 단계 (b)의 옥수수전분 당화액을 90~110℃에서 5~15분 동안 열처리하여 반응을 종료시키는 단계; 및

[33] (d) 상기 단계 (c)에서 반응을 종료시킨 옥수수전분 당화액을 동결건조하여 분말화하는 단계를 포함하여 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[34] 옥수수전분 당화액 제조 단계에 사용된 펑가밀(fungamyl)은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus* oryzae) 유래의 α-아밀라제 효소이며, 프로모자임(promozyme)은 풀루라나제(pullulanase) 효소이다.

[35] 상기의 방법을 통해 제조된 옥수수전분 당화액은 말토오스 이상의 글루코오스 중합도를 갖는 글루코오스 중합체와 글루코오스와의 비율이 약 7:3인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[36] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 다당체의 생산 방법에서, 상기 다당체는 포도당을 단위체로 한 알파-1,4 글루코시드 결합 및 알파-1,6 글루코시드 결합으로 이루어지며, 분자량이 3,580~4,640 kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[37] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 다당체의 생산 방법에서, 상기 단계 3)의 다당체의 추출 방법은 상기 단계 2)에서 획득한 배양된 균체에 고온고압 처리한 후 유기용매를 첨가하여 다당체를 추출하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 단계 2)에서 획득한 배양된 균체에 110~130℃ 및 10~30psi의 조건으로 20~60분 동안 고온고압 처리한 후 유기용매를 첨가하여 다당체를 침전시킨 다음, 침전물로부터 다당체를 추출하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 배양된 균체에 121℃ 및 15psi의 조건으로 40분 동안 고온고압 처리한 후 유기용매를 첨가하여 다당체를 침전시킨 다음, 침전물로부터 다당체를 추출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[38] 상기 다당체 추출을 위한 유기용매는 에탄올일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[39]

[40] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[41]

[42] **실시예** 1. 옥수수전분 당화액 분말 제조

[43] 본 발명에서는 대량의 다당체 생산을 위해 대장균 변이체 TBP38(JOURNAL OF BACTERIOLOGY, May 2011, p. 2517-2526) 균주를 이용하였으며, 상기 대장균 변이체 TBP38 균주의 배양 배지에서 2차 공급용 탄소원으로 최적의 탄소원을 공급하기 위해, 50mM의 아세트산나트륨(sodium acetate) 완충용액(pH 4.7)에 30%(w/v)의 옥수수전분을 첨가하여 호화용액을 제조한 후, 57℃에서 중탕하며 평가밀(fungamyl, Novozymes, 덴마크) 및 프로모자임(promozyme D2, Novozymes)을 각각 1%(w/v)씩 첨가하여 24시간 동안 반응시켜 옥수수전분 당화액을 제조하였다. 이후에, 상기 옥수수전분 당화액을 100℃에서 10분간 열처리하여 반응을 종료시켰으며, 그 후 옥수수전분 당화액을 동결건조하여 분말화한 후, 하기 실시예 2에서 고농도 세포 배양 배지의 2차 공급용 탄소원으로 사용하였다.

[44] 상기 옥수수전분 당화액에 대해 고성능 음이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography)를 이용하여 그 조성을 분석한 결과, 도 1 및 표 1에 개시한 바와 같이 옥수수전분 당화액은 글루코오스(glucose), 말토오스(maltose), 말토트리오스(maltotriose), 말토테트라오스(maltotetraose), 말토펜타오스(maltopentaose) 및 말토헥사오스(maltohexaose)를 함유하고 있는 것으로 확인되었다.

[45] [표1]

옥수수전분 당화액의 구성비율(%)

구분	구성비율(%)
글루코오스(glucose)	29.5
말토오스(maltose)	31.2
말토트리오스(maltotriose)	20.4
말토테트라오스(maltotetraose)	8.3
말토펜타오스(maltopentaose)	8.5
말토헥사오스(maltohexaose)	2.1
합계	100

[46]

[47] 실시예 2. 고농도 세포 배양

[48] 본 실시예 2에서는 고농도 세포 배양을 이용하여 다당체를 생산하는 대장균 변이체 TBP38 균주를 대량 배양하고 이로부터 다당체를 대량 추출하고자 하였다. 고농도 세포 배양에 사용한 배지는 하기 표 2에 개시한 바와 같다. 하기 배지는 제한 배지로서 최소한의 영양 요구성을 만족시켜 사용한 균주의 대사를 원하는 대로 조절할 수 있는 장점이 있다. 상기 균주의 대량 배양을 위해, 1차 공급용 탄소원을 글루코오스(glucose)로 고정하고, 2차 공급용 탄소원으로 글루코오스(TEST 1), 말토오스(TEST 2) 및 옥수수전분 당화액 분말(TEST 3)을 사용하였다.

[49] 배양 과정은 도 2에 개시한 바와 같이 계대배양(subculture), 종균배양-1(seed culture-1), 종균배양-2(seed cultrue-2) 및 본 배양(main culture)까지 총 4단계를 거쳐 실시하였다. 구체적으로, 계대배양은 항생제인 클로람페니콜(Chloramphenicol)과 LB 배지(Luria-Bertani media)를 혼합한 고체 배지에 균을 도말한 후 37℃에서 12시간 동안 실시하였으며, 계대배양 후, 하기 표 2에 개시한 배지 조성으로 종균배양-1을 37℃에서 11시간 동안 실시하였다. 종균배양-1이 끝난 후, 종균배양-1과 같은 배지 조성으로 종균배양-2를 실시하였으며, 대신 부피는 60mL로 증가시킨 후 종균배양-1에서 약 2%(1.2 mL)을 취하여 접종하였으며, 37℃에서 약 10시간 동안 배양하고, 중간에 샘플 1mL씩 따로 수집하여 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 600nm에서 O.D값(optical density)을 측정하였으며, O.D값이 1.3~1.4에 도달하였을 때, 본 배양의 배지에 접종하였다. 본 배양은 발효기(씨엔에스, MARADO-2.5D-XS)를 이용하여 진행하였으며, 배양시 하기 표 2에 개시한 배지에 항생제인 클로람페니콜을 첨가하여 사용하였다. 배양 볼륨은 2.5L로, 종균배양-2로부터 최종 배양 부피의 2%(50mL)을 취하여 접종하였다. 배양이 원활하게 진행되기 위해, 배양 중 O.D값에 따라 임펠러(Impeller) 속도는 800rpm으로 고정하였으며, 용존산소량(DO값)은 30이 되도록 공기주입양을 설정하여 37℃에서 배양하였으며, 2차 탄소원은 O.D값이 10일 때 하기 표 2에 개시된 것과 같이 공급하였고, 원하는 최고 O.D값에 도달할 때까지 각각 배양을 진행하였다. 상기 배양액을 원심분리(9000rpm, 15분, 4℃)하여 세포를 회수한 후 중량을 측정하였다.

[50] 그 결과, 도 3 및 표 3에 개시한 바와 같이 2차 공급용 탄소원으로 글루코오스(TEST 1) 및 말토오스(TEST 2)를 사용하였을 때보다 옥수수전분 당화액 분말(TEST 3)을 사용하였을 때, 대장균 변이체 TBP38 균주의 배양 O.D값이 현저하게 높았으며, 회수 균체 중량도 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

[51] [표2]

본 발명에 사용된 배지 조성

구분	TEST 1	TEST 2	TEST3
본 배양 및 종균 배양용배지 조성	$(NH_4)_2 \cdot HPO_4$ 2g/L		
	KH_2PO_4 6.75g/L		
	시트르산 0.85g/L		
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.7g/L		
	글루코오스 20g/L		
	Trace metal solution* 5ml/L		
2차 공급용탄소원 조성	- 800g/L 글루코오스(시그마알드리치사)- 20 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	- 800g/L 말토오스(시그마알드리치사)- 20 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	- 800g/L 옥수수전분 당화액 분말- 20g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
항생제	클로람페니콜(Chloramphenicol)		

[52] *Trace metal solution은 5N 염산용액 1리터당 10g의 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.25g의 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g의 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.23g의 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 2g의 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 및 0.1g의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$로 조성되어 있다.

[53] [표3]

본 발명의 방법으로 배양된 대장균 변이체 TBP38 균주의 회수량

구분	TEST 1	TEST 2	TEST 3
최종배양액량(ml)	800	800	800
회수균체중량(g)	33.6	31.2	37.4

[54]

[55] **실시예** 3. 다당체 추출

[56] 상기 실시예 2를 통해 획득한 균체로부터 다당체를 추출하기 위해, 도 4에 개시한 바와 같이 초음파 처리 방법과 고온고압처리 방법을 사용하여 균체로부터 다당체를 회수하였다. 간단하게, 고온고압처리 방법은 획득한 균체를 증류수로 재부유시키고, 121℃ 및 15psi의 조건으로 40분 동안 고온고압처리한 후 원심분리하여 상등액만 취한 후, 상기 상등액에 2배 부피(v/v)의 에탄올을 첨가하여 반응시킨 후 원심분리하여 침전물(다당체 함유)을 회수한 다음, 침전물로부터 다당체를 추출하였다.

[57] 균체로부터 다당체를 추출하기 위해 통상적으로 많이 사용되는 초음파 처리 방법과 비교한 결과, 하기 표 4에 개시한 바와 같이 초음파 처리 방법보다 고온고압처리 방법을 이용하였을 때, 다당체의 회수량이 더 많은 것을 확인할 수

있었다. 특히, 2차 탄소원으로 옥수수전분 당화액을 이용한 경우(TEST 3)에 초음파 처리 방법에 비해 고온고압 처리 방법에서 약 2g의 다당체가 더 회수되어, 고온고압처리 방법이 약 1.4배 증가된 다당체 회수율을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[58] [표4]

균체로부터 다당체 회수량 비교

구분	초음파 처리 후 회수량(g)	고온고압처리 후회수량(g)
TEST 1	0.1	0.1
TEST 2	3.2	4.6
TEST 3	4.6	6.5

[59]

청구범위

[청구항 1] 1) 대장균(*Escherchia* coli) 변이체 TBP38 균주를 1차 탄소원으로 글루코오스를 포함하는 배지에서 배양하는 단계;
2) 상기 단계 1)의 배양액에 2차 탄소원을 첨가한 후 20~30시간 동안 배양하고 배양된 균체를 획득하는 단계; 및
3) 상기 단계 2)에서 획득한 배양된 균체로부터 다당체를 추출하는 단계를 포함하는 다당체의 생산 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 대장균(*Escherchia* coli) 변이체 TBP38 균주는 포도당을 단위체로 한 알파-1,4 글루코시드 결합 및 알파-1,6 글루코시드 결합으로 이루어진 다당체를 생산하는 균주인 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 2차 탄소원은 상기 단계 1)의 배양액의 O.D값이 8~20일 때 첨가하는 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 2차 탄소원은 글루코오스(glucose), 말토오스(maltose), 말토트리오스(maltotriose), 말토테트라오스(maltotetraose), 말토펜파오스(maltopentaose) 및 말토헥사오스(maltohexaose)로 이루어진 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 2차 탄소원은 옥수수전분 당화액 분말인 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 옥수수전분 당화액 분말은
(a) 아세트산나트륨(sodium acetate) 완충용액에 옥수수전분을 첨가하여 옥수수전분 호화액을 제조하는 단계;
(b) 상기 단계 (a)의 옥수수전분 호화액에 펑가밀(fungamyl) 및 프로모자임(promozyme)을 첨가한 후 반응시켜 옥수수전분 당화액을 제조하는 단계;
(c) 상기 단계 (b)의 옥수수전분 당화액을 열처리하여 반응을 종료시키는 단계; 및
(d) 상기 단계 (c)에서 반응을 종료시킨 옥수수전분 당화액을 동결건조하여 분말화하는 단계를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

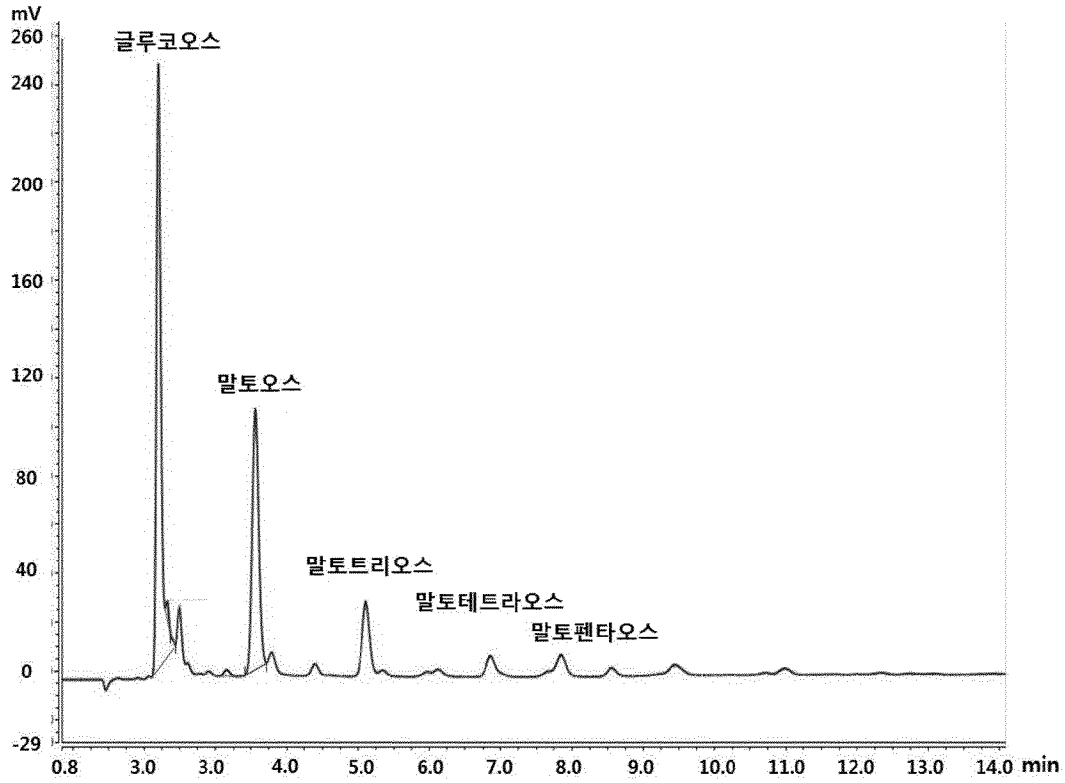
[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 다당체는 포도당을 단위체로 한 알파-1,4 글루코시드 결합 및 알파-1,6 글루코시드 결합으로 이루어지며, 분자량이 3,580~4,640 kDa인 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 단계 3)의 다당체의 추출 방법은 상기 단계 2)에서 획득한 배양된 균체에 고온고압 처리한 후 유기용매를 첨가하여 다당체를 추출하는 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

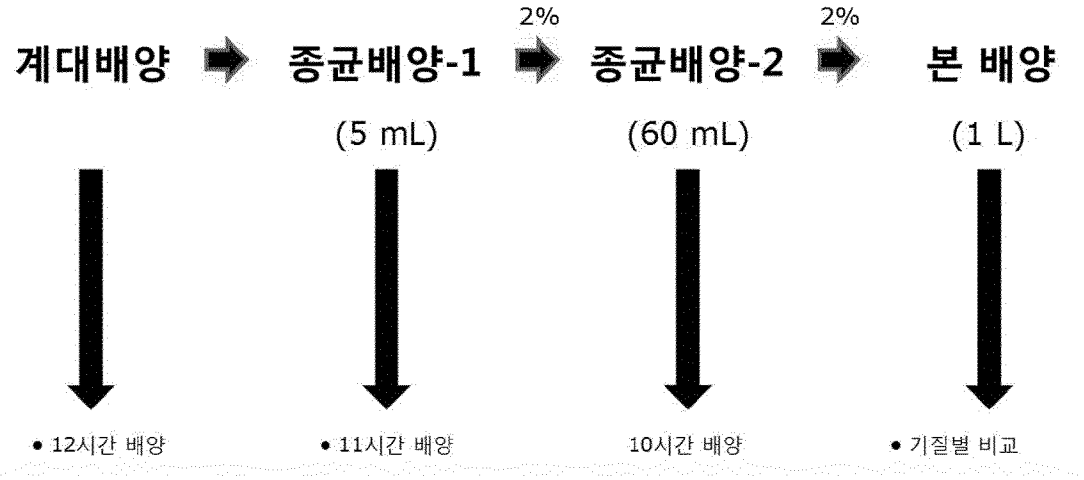
[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 단계 3)의 다당체의 추출 방법은 상기 단계 2)에서 획득한 배양된 균체에 110~130℃ 및 10~30psi의 조건으로 20~60분 동안 고온고압 처리한 후 유기용매를 첨가하여 다당체를 침전시킨 다음, 침전물로부터 다당체를 추출하는 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 유기용매는 에탄올인 것을 특징으로 하는 다당체의 생산 방법.

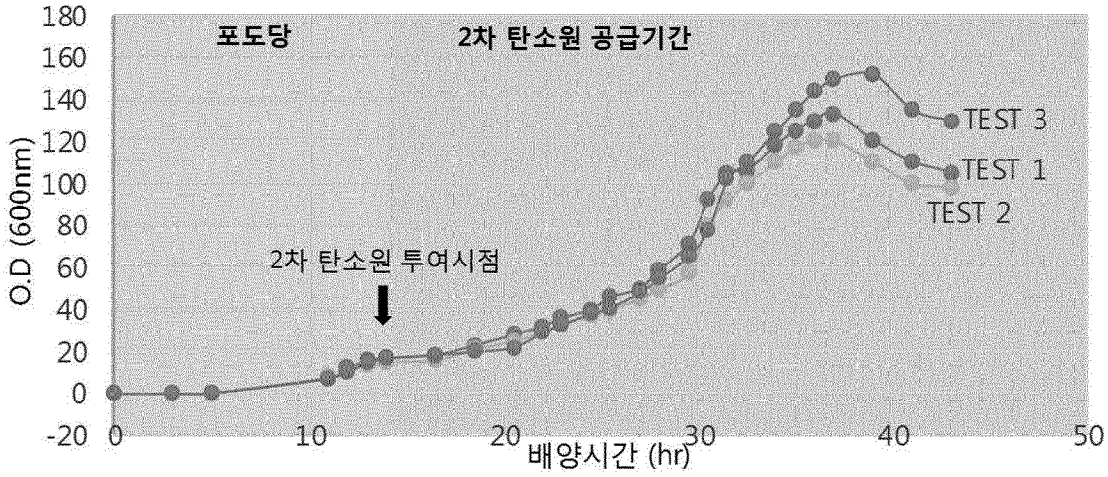
[도1]


mV
260
240
200
160
120
80
40
0
-29
글루코오스
말토오스
말토트리오스
말토테트라오스
말토펜타오스
0.8
3.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10.0
11.0
12.0
13.0
14.0
min

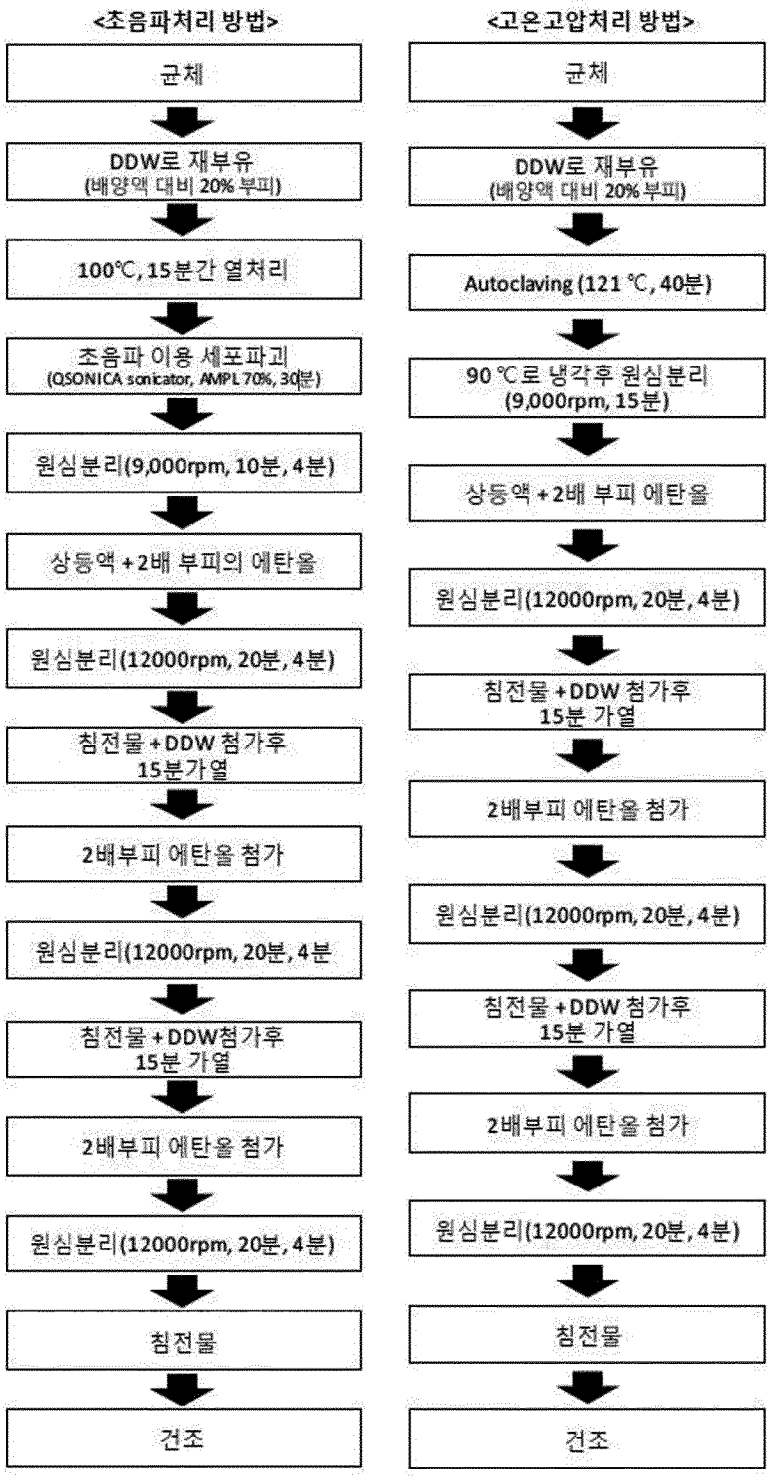
[도2]


계대배양
종균배양-1
2%
종균배양-2
2%
본 배양
(5 mL)
(60 mL)
(1 L)
• 12시간 배양
• 11시간 배양
10시간 배양
• 기질별 비교

[도3]


포도당
2차 탄소원 공급기간
TEST 3
TEST 1
TEST 2
2차 탄소원 투여시점
O.D (600nm)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
10
20
30
40
50
배양시간 (hr)

[도4]


<초음파처리 방법>
균체
DDW로 재부유
(배양액 대비 20% 부피)
100℃, 15분간 열처리
초음파 이용 세포파괴
(QSONICA sonicator, AMPL 70%, 3Q분)
원심분리(9,000rpm, 10분, 4분)
상등액 +2배 부피의 에탄올
원심분리(12000rpm, 20분, 4분)
침전물 + DDW 첨가후
15분가열
2배부피 에탄올 첨가
원심분리(12000rpm, 20분, 4분
침전물 + DDW첨가후
15분 가열
2배부피 에탄올 첨가
원심분리(12000rpm, 20분, 4분)
침전물
건조
<고온고압처리 방법>
균체
DDW로 재부유
(배양액 대비 20% 부피)
Autoclaving (121 ℃, 40분)
90 ℃로 냉각후 원심분리
(9,000rpm, 15분)
상등액 +2배 부피 에탄올
원심분리(12000rpm, 20분, 4분)
침전물 + DDW 첨가후
15분 가열
2배부피 에탄올 첨가
원심분리(12000rpm, 20분, 4분)
침전물 + DDW 첨가후
15분 가열
2배부피 에탄올 첨가
원심분리(12000rpm, 20분, 4분)
침전물
건조