



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월23일
(11) 등록번호 10-0797152
(24) 등록일자 2008년01월16일

(51) Int. Cl.

C12N 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0116688

(22) 출원일자 2006년11월24일

심사청구일자 2006년11월24일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020020020828 A

KR1020040082060 A

US5795771 A

US6750045 A

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김승욱

서울시 성북구 안암5가 1번지 고려대학교 공학관 734호

강성우

서울시 성북구 안암5가 1번지 고려대학교 공학관 734호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현, 윤여강, 이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이재정

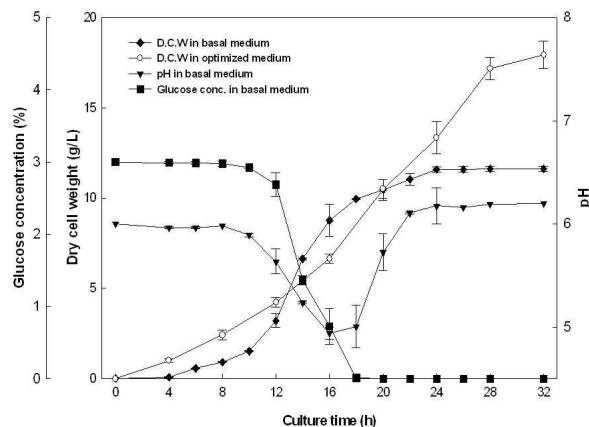
(54) β -글루칸을 다량 함유하는 개량된 사카로마이세스세레비지에 JUL3 균주의 대량 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 β -글루칸을 다량 함유하는 개량된 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 (*Saccharomyces cerevisiae* JUL3) 균주의 최적 생산 조건인 배지조성을 확립하는 단계; 상기 조건하에서 발효시킨 JUL3의 세포생산량 비교단계; scale-up에 필요한 최적 배지조성 및 배양조건 확립 단계; 및 상기 최적 배지조성 및 배양조건하에서 유가식 배양의 최적화에 필요한 기질 유입속도 (feed rate)와 기질 농도를 최적화하는 단계를 포함하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 생산방법은 효모의 세포벽 구성성분인 β -글루칸(β -glucan)의 조성을 변화시켜 생리활성이 뛰어난 β -글루칸을 모균주보다 다량 함유하는 개량된 효모인 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 균주를 당밀 (molasses)과 옥수수 농침액 (corn steep liquor)의 값싼 배지를 통계학적 분석방법(response surface methodology)과 유가식 배양 (fed-batch)을 이용하여 β -글루칸을 다량 함유한 균체를 대량 생산할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이종호

서울시 성북구 안암5가 1번지 고려대학교 공학관
734호

김영환

서울시 성북구 안암5가 1번지 고려대학교 공학관
734호

장효일

서울시 성북구 안암5가 고려대학교 생명공학원

윤철원

서울시 성북구 안암5가 고려대학교 생명공학원

백현동

서울시 광진구 화양동 1번지 건국대학교

강창원

서울시 광진구 화양동 1번지 건국대학교

특허청구의 범위

청구항 1

β -글루칸을 다량 함유하는 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 (*Saccharomyces cerevisiae* JUL3)(기탁번호 KFCC11359p) 균주의 최적 배지조성을 통계학적 분석방법인 반응표면 분석방법 (response surface methodology)을 이용하여 확립하는 1 단계; 상기 배지조성에서 발효시킨 JUL3의 세포생산량 비교하는 2 단계; 상기 1 단계의 배지조성을 이용하여 scale-up에 필요한 배양조건 확립하는 3 단계; 및 상기 최적 배지조성 및 배양조건하에서 유가식 배양의 최적화에 필요한 기질 유입속도 (feed rate)와 기질 농도를 최적화하는 4 단계를 포함하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 1 단계에서 확립된 최적 배지조성은 당밀 (molasses) 5 ~ 7 %, 옥수수 농침액 (corn steep liquor) 15 ~ 19 %, KH_2PO_4 0.3 ~ 0.7 %, MgSO_4 0.05 ~ 0.15 % 및 소량의 미네랄을 포함하는 배양배지인 것을 특징으로 하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 3단계에서 scale-up에 필요한 최적 배양조건은 2.5L 발효조에서 교반속도 200 ~ 400 rpm, 통기량 1 ~ 3 vvm인 것을 특징으로 하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 4단계에서 유가식 배양은 JUL3의 지수성장기인 배양시작 18시간 후에 당밀을 30 ~ 75 %의 농도로 10 ~ 20 mL/h의 유속으로 첨가하여 배지내 당 농도를 일정하게 유지하는 것을 특징으로 하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법.

청구항 5

당밀 (molasses) 5 ~ 7 %, 옥수수 농침액 (corn steep liquor) 15 ~ 19 %, KH_2PO_4 0.3 ~ 0.7 %, MgSO_4 0.05 ~ 0.15 % 및 소량의 미네랄을 포함하는 것을 특징으로 하는 JUL3 균주를 고농도로 배양하기 위한 배지조성물.

청구항 6

당밀 (molasses) 5 ~ 7 %, 옥수수 농침액 (corn steep liquor) 15 ~ 19 %, KH_2PO_4 0.3 ~ 0.7 %, MgSO_4 0.05 ~ 0.15 % 및 소량의 미네랄을 포함하는 배양배지에서 2.5L 발효조, 교반속도 200 ~ 400 rpm, 통기량 1 ~ 3 vvm으로 scale-up에 필요한 배양조건하에서 사카로마이세스 세레비지에 JUL3의 지수성장기인 배양시작 18시간 후에 당밀을 30 ~ 75%의 농도로 10 ~ 20 mL/h의 유속으로 첨가하여 배지내 당 농도를 일정하게 유지하는 유가식 배양을 하는 것을 특징으로 하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6> 본 발명은 β -글루칸 (β -glucan)을 다량 함유하는 개량된 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 (*Saccharomyces cerevisiae* JUL3) 균주의 대량 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 JUL3의 최적 생산 조건인 배지조성을 확립하는 단계; 상기 조건하에서 발효시킨 JUL3의 세포생산량 비교단계; scale-up에 필요한 최적 배지조성 및 배양조건 확립 단계; 및 상기 최적 배지조성 및 배양조건하에서 유가식 배양의 최적화에 필요한 기질 유입속도 (feed rate)와 기질 농도를 최적화하는 단계를 포함하는 JUL3 균주의 대량생산 방법에 관한 것이다.

<7> 본 발명은 효모의 세포벽 구성성분인 β -글루칸 (β -glucan)의 조성을 변화시켜 생리활성이 뛰어난 β -글루칸을 모균주보다 다량 함유하는 개량된 효모인 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) JUL3 균주를

당밀 (molasses)과 옥수수 농침액 (corn steep liquor)의 값싼 배지를 통계학적 분석방법 (response surface methodology)과 유가식 배양 (fed-batch)을 이용하여 β -글루칸을 다량 함유한 균체를 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

- <8> 피부 생리활성 물질중의 하나인 β -글루칸 (β -glucan)은 효모의 세포벽의 가장 많은 양의 구성성분으로 세포벽에서 추출되거나 보리, 귀리와 같은 맥아류의 식이섬유에서 추출되고 항암, 항-콜레스테롤, 면역증강 및 피부 재생 등과 같은 여러 가지 생리활성 촉진효과가 있다고 보고되며 특히, 효모로부터 얻어지는 β -글루칸은 피부를 보호하고 피부 손상 시 피부를 재생시키는 역할을 하며, 인체 내에서 면역시스템을 강화시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있어 건강식품의 첨가물로 효모에서 추출한 β -글루칸의 이용이 증가되고 있다.
- <9> 오랫동안 많은 연구가 미생물 유래의 β -글루칸과 식물 유래의 β -글루칸에 대한 연구를 수행해 왔으나 실제로 함량이 낮고 정제가 어려워 가격이 높다. 이처럼 낮은 생산성을 보이는 β -글루칸을 대량 생산하기 위하여 세포 내 β -글루칸의 함량을 높이는 균체개발의 연구와 세포의 균체량을 증가시켜야 하는 연구가 수행되어야 한다. 이처럼 균체를 개발하는 선행 기술로는 미국특허 (US patent) 3,855,063호에서 보면 글루카나제 (glucanase)에 저항성을 나타내는 돌연변이 변이주를 선별함으로써 글루카나제에 의한 가수분해에 저항성을 보이고 흡수능력이 우수한 입자크기 0.2 ~ 10 마이크로미터 사이의 글루칸을 제조하는 방법이 연구되었다.
- <10> 그러나 효모의 균체량을 증가시켜야 하는 공정변수를 확립하거나 최적화하는 연구는 개시된 바 없으며, 따라서 본 발명의 목적은 선별된 우수 균주를 이용하여 보다 경제적으로 세포를 대량생산 하는 기술의 개발하여 β -글루칸의 대량 생산에 적합한 공정을 개발하여 제공하는 것이다.
- <11> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 균주의 대량 생산 방법의 경우, β -글루칸을 다량 함유하는 균체를 경제적으로 대량 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <12> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 균주개발의 결과 β -글루칸을 다량 함유하는 균주인 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) JUL3의 세포생산에 필요한 배지조성 중 생산 단가를 줄일 수 있는 배지조성을 통계학적 분석방법을 통하여 최적화하고 공정변수를 최적화하여 경제적으로 세포 생산을 증가시킬 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <13> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 β -글루칸을 다량 함유하는 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 (*Saccharomyces cerevisiae* JUL3)(기탁번호 KFCC11359p) 균주의 최적 배지조성을 통계학적 분석방법인 반응표면 분석방법 (response surface methodology)을 이용하여 확립하는 1 단계; 상기 배지조성에서 발효시킨 JUL3의 세포생산량 비교하는 2 단계; 상기 1 단계의 배지조성을 이용하여 scale-up에 필요한 배양조건 확립하는 3 단계; 및 상기 최적 배지조성 및 배양조건하에서 유가식 배양의 최적화에 필요한 기질 유입속도 (feed rate)와 기질 농도를 최적화하는 4 단계를 포함하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법을 제공한다.
- <14> 본 발명에 있어서, 상기 1 단계에서 확립된 최적 배지조성은 당밀 (molasses) 5 ~ 7%, 옥수수 농침액 (corn steep liquor) 15 ~ 19%, KH_2PO_4 0.3 ~ 0.7%, MgSO_4 0.05 ~ 0.15% 및 소량의 미네랄을 포함하는 배양배지인 것을 특징으로 하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법인 것이 바람직하다.
- <15> 본 발명에서는 통계학적 실험설계 (statistical experimental designs)를 이용하여 사카로마이세스 세레비지에 JUL3의 균체생산의 최적조건을 확립하기 위하여, 실험설계는 실시예 1에 기술한 것처럼 12개 세트 (최적화실험의 모집단에서 취한 표본으로 중복되지 않는 최소한의 실험 조합)로 구성된 분류변수 설계를 실시하였고, 세포 성장에 영향을 주는 가장 중요한 요소를 결정하는데 사용하였다. 또한 세포 성장에 필요한 주요 독립변수들의 최적 조건을 결정하기 위해 반응표면분석방법을 도입하였다.
- <16> 일반적으로, 반응표면 분석방법은 반응표면분석은 여러 개의 설명변수가 복합적인 작용을 함으로써 어떤 변수에 영향을 주고 있을 때 이러한 반응의 변화가 이루는 반응표면에 대한 통계적인 분석 방법을 말한다. 본 발명에서는 반응변수 (종속변수, 균체량)와 설명변수 (독립변수, 당밀과 옥수수 농침액의 농도)들간의 관계를 규명하고 최적조건을 찾기 위하여 이러한 방법을 사용하였다.
- <17> 본 발명에서는 상기 반응표면분석방법을 통해 세포성장을 위한 당밀과 옥수수 농침액의 최적값을 얻었으며, 효

모 성장을 위한 기본배지 (basal medium)조성에 비해서 본 발명의 최적화 배지조성에서 증가된 균체체량은 늦게 상승하지만 성장단계가 길어 균체량은 더욱 증가되었다. 또한, 본 발명에서는 기본배지와 최적화배지에서의 세포벽 내 β -글루칸을 비교하였다. 표 4는 기본배지와 최적화한 배지를 이용하여 생산된 균체에서 β -글루칸의 함량을 비교한 것이며, 당밀과 옥수수 농침액에 의한 β -글루칸 함량의 변화는 거의 없어 세포의 고농도 배양에 적합한 배지임을 나타내었다.

- <18> 본 발명에 있어서, 상기 3단계에서 scale-up에 필요한 최적 배양조건은 2.5L 발효조에서 교반속도 200 ~ 400 rpm, 통기량 1 ~ 3 vvm인 것을 특징으로 한다.
- <19> 본 발명의 scale-up에 필요한 최적 배양조건은 발효조의 크기에 따라 그 교반속도와 통기량을 적절하게 조정할 수 있으나, 바람직하게는 2.5L 발효조에서 교반속도 200 ~ 400 rpm, 통기량 1 ~ 3 vvm인 것을 특징으로 한다. 도 3에서 나타난 것과 같이, 세포가 가장 많이 생산된 교반속도는 400 rpm이었으나 350 rpm과 비교할 때, 세포의 건중량의 차이가 1.8 g/L로 근소한 차이를 보이기는 하지만 세포의 고농도 배양과 에너지 측면을 고려할 때, 350 rpm이 더 적당한 교반속도를 나타내었다.
- <20> 본 발명에 있어서, 상기 4단계에서 유가식 배양은 JUL3의 지수성장기인 배양시작 18시간 후에 당밀을 30 ~ 75 %의 농도로 10 ~ 20 mL/h의 유속으로 첨가하여 배지내 당 농도를 일정하게 유지하는 것을 특징으로 한다.
- <21> 본 발명의 유가식 배양은 종래의 회분식 배양과 달리, 세포 성장으로 소모된 기질을 연속적으로 발효조 내에 투입함으로써, 균체를 고농도로 대량 생산할 수 있는 배양 방법이다. 발효중인 배지내 당 농도가 낮으면 고농도로 세포를 배양시키기 어려우며, 배지내 당 농도가 높을 경우 알콜 발효를 유발시켜 세포성질을 억제하게 된다. 따라서, 유가식 배양에 의하여 발효중인 배지내 당 농도를 일정하게 유지함으로써 대량 생산에 적합한 배양조건을 제공할 수 있다.
- <22> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 효모 돌연변이 균주인 사카로 마이세스 세레비지에 JUL3의 배양을 위한 배지조성물에 있어서, 당밀 (molasses) 5 ~ 7 %, 옥수수 농침액 (corn steep liquor) 15 ~ 19 %, KH_2PO_4 0.3 ~ 0.7 %, MgSO_4 0.05 ~ 0.15 % 및 소량의 미네랄을 포함하는 것을 특징으로 하는 JUL3 균주를 고농도로 배양하기 위한 배지조성물을 제공한다.
- <23> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 당밀 (molasses) 5 ~ 7 %, 옥수수 농침액 (corn steep liquor) 15 ~ 19 %, KH_2PO_4 0.3 ~ 0.7 %, MgSO_4 0.05 ~ 0.15 % 및 소량의 미네랄을 포함하는 배양배지에서 2.5L 발효조, 교반속도 200 ~ 400 rpm, 통기량 1 ~ 3 vvm으로 scale-up에 필요한 배양조건을 확립하고, 상기 확립된 배양조건하에서 사카로마이세스 세레비지에 JUL3의 지수성장기인 배양시작 18시간 후에 당밀을 30 ~ 75 %의 농도로 10 ~ 20 mL/h의 유속으로 첨가하여 배지내 당 농도를 일정하게 유지하는 유가식 배양을 포함하는 JUL3 균주의 대량 생산 방법을 제공한다.
- <24> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- <25> 실시예 1. 통계학적 분석방법 (statistical analysis method)을 통한 사카로마이세스 세레비지에 JUL3의 최적 생산조건 확립
- <26> 세포벽의 구성성분인 β -글루칸의 함량이 높은 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 (기탁번호 KFCC11359p, 한국미생물보존센터에 2005년 11월 18일 보관기탁함.)은 UV (ultraviolet) 돌연변이를 통해 사카로마이세스 세레비지에 JH로부터 분리하였다 (C.H.Ha, et al., 2002; Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants, C.H.Ha, et al., 2006; Immune-Enhancing Alkali-Soluble Glucans Produced by Wild-Type and Mutant *Saccharomyces cerevisiae*). 상기균주를 YPD agar에서 30℃, 2일 동안 배양하였고, 40% 글리세롤/60% YPD broth 비율로 스톡(stock)을 만들어 -70℃에서 보관하였다. 접종을 위한 기초배지의 조성은 2% 글루코오스, 1% 효모추출물, 2% 백토펙톤의 조성이며 pH는 6.0으로 적정하였다. 효모의 콜로니는 기초배지 50 mL이 든 삼각 플라스크에 접종하였으며 16시간동안 30℃, 200rpm으로 배양하였다. 세포생산을 위한 주 배양 (main culture) 배지는 2% 글루코오스, 1% 효모추출물, 2% 백토펙톤, 0.5 % KH_2PO_4 , 0.1 % MgSO_4 의 조성이며 pH는 6.0으로 적정하였고 세포 생산을 위해 통계학적 분석방법을 통해 설계한 배지는 실험설계 (표 1)에 따라 제조하였으며, pH는 6.0으로 적정하였다. 상기 배양액 1 mL은 주 배양 (main culture)을 위해 각각의 실험배지 100 mL이 든 250 mL-삼각 플라스크에 접종하여 32시간 동안 30℃, 200 rpm으로 배양

하였다.

<27> 세포의 건중량은 중량측정방법으로 측정하였으며, 세포는 원심분리기를 통해 9000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 회수하였으며 멸균수로 세 번 세척한 다음 세포를 80 ℃의 건조기에서 48시간 동안 건조시켰다.

<28> 배지 내 글루코오스 함량은 글루코오스 키트 (영동 주식회사, 한국)를 이용하여 측정하였다.

<29> 통계학적 실험설계 (statistical experimental designs)를 이용하여 사카로마이세스 세레비지에 (Saccharomyces cerevisiae) JUL3의 균체생산을 최적조건을 확립하기 위하여, 실험설계는 12개 세트로 구성된 분류변수 설계를 실시하였고, 세포성장에 영향을 주는 가장 중요한 요소를 결정하는데 사용하였다. 각 변수는 식 1에 따라 할당 되었다.

<30>
$$x_i = (x_i - x_0) / \Delta x_i \dots \dots \dots (1)$$

<31> 여기서, x_i 는 독립변수의 코드화된 값(coded value), x_i 는 독립변수의 실제값 (real value), x_0 은 중앙값 (center point)에서 독립변수의 실제값 (real value)이며, Δx_i 는 단계별 변화값 (step change value)을 나타낸다. 본 발명에서 조사되는 변수들의 범위와 수치는 표 1에 나타내었다. 실험데이터의 실험적 적합성은 분산분석 (Analysis of variance)을 통하여 산출된 다항식 회귀 (polynomial regression)에 따랐다.

<32> 2차 다항식 (empirical second-order polynomial model)을 적합화하기 위해, 5개의 코드화 수준을 가진 중앙 혼합설계 (central composite design)을 실시하였으며 통계적 실험설계의 거동은 다음과 같은 2차 다항식으로 설명되어질 수 있다.

<33>
$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \dots \dots \dots (2)$$

<34> 단, y 는 반응 변수이고, β 는 회귀계수 (regression coefficients), x 는 독립변수의 코드화 수준(coded level)이다. 얻어진 실험값의 통계학적 분석을 위해 SAS 9.1.3 package를 사용하였다. 2차 다항식의 통계적 유의성은 F-값에 따라 결정하였으며, 상기 식에 따라 설명된 편차는 복합결정계수 (multiple coefficient of determination), R^2 에 따라 제공되었다.

<35> [표 1]. 중앙 혼합 설계(central composite design)를 위한 각 변수의 범위

Factors	Symbol	Coded values				
		- 1.414	- 1	0	+ 1	+ 1.414
Molasses	X_1 (%v/v)	3.17	4	6	8	8.83
C.S.L	X_2 (% v/v)	7.93	10	15	20	22.1

<36> [표 2]. 중앙 혼합 설계(central composite design)의 실험 설계 및 그 결과

Runs	Coded values		
	X ₁	X ₂	Dry cell weight (g/L)
1	+ 1	+ 1	9.47
2	+ 1	- 1	8.50
3	- 1	+ 1	9.01
4	- 1	- 1	7.29
5	+ 1.414	0	9.12
6	- 1.414	0	8.05
7	0	+1.414	9.38
8	0	- 1.414	7.87
9	0	0	8.21
10	0	0	9.92
11	0	0	9.11
12	0	0	8.25

0.5% KH₂PO₄, 0.1% MgSO₄

<38>

<39> [표 3]. 당밀과 옥수수 농침액에서 세포 중량 모델에 대한 통계학적 분석 결과

소스 (Source)	제곱합	자유도	평균제곱	F-값	P-값
모델	5.714	5	1.143	12.04	0.016
오차	0.379	4	0.095		
총	6.093	9			

변동계수(CV) = 3.512 %, $R^2 = 0.938$

<40>

<41> 당밀(x_1)과 옥수수 농침액 (x_2) 독립변수들의 최적 조건을 결정하기 위해 반응표면분석방법(response surface methodology)을 도입하였다. 나머지 변수는 0.5% KH₂PO₄, 0.1% MgSO₄에 배치하였다. 실험은 중앙값에 4개의 스타 포인트 (four star points, $\alpha = \pm 1.414$)와 중앙값의 4회 반복 (four replicates)을 포함하는 2^2 full factorial desing experiment를 이용하여 두 개의 독립변수 당밀(x_1)과 옥수수 농침액 (x_2)을 가지고 실시하였다 (표 2).

<42> 표 3에 나타난 바와 같이, F-값과 P-값은 각각 12.04와 0.016였다. 2차방정식의 통계적인 유의성을 점검하였고, 모델의 결정계수 (R^2)는 0.938으로 반응의 변이성의 93.8%는 모델에 의해 설명될 수 있음을 나타내었다. 변동계수 (Coffeicient of variation, CV)는 3.512로 비교적 낮은 수치를 나타내어 균체량 생산에 변수들의 독립적인 영향이 있을 뿐만 아니라 변수들의 상호작용도 높음을 나타내었다. 반응 방정식은 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) JUL3의 균체생산 실험의 반응면에 적합한 모델을 제공하였으며, 다음과 같다.

<43>
$$y = 9.514 + 0.399x_1 + 0.604x_2 - 0.473x_1^2 - 0.455x_2^2 - 0.191x_1x_2$$

<44> 단, X_1 은 코드화된 당밀의 값, X_2 은 코드화된 효모 추출물의 값을 나타낸다.

<45> 도 1은 계산된 반응표면의 3차원 도면과 등고선을 도시화한 것이다. 세포 성장을 위해 얻어진 당밀(X_1)과 옥수수 농침액 (X_2)의 최적값은 0.213과 0.425였다. 상기 결과들에 따라 6.4% 당밀(X_1)과 17% 옥수수 농침액(X_2)이 세포

생산을 위한 최적값으로 최적화되었다. 통계학적 모델에 의하여 예측되는 균체량의 최대값은 9.76 g/L였다.

<46> 결론적으로 6.4% 당밀, 17% 옥수수 농침액, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% MgSO_4 가 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) JUL3의 균체를 대량 생산하기 위한 최적조건임을 확인하였다.

<47> 실험 예 1. 통계적 실험 설계에 따른 사카로마이세스 세레비지에 JUL3의 균체량 생산의 최적조건의 증명

<48> 상기 통계학적 실험 설계에 따라 설정된 세포의 최적생산조건을 증명하기 위해, 상기 최적조건인 6.4% 당밀, 17% 옥수수 농침액, 0.5% KH_2PO_4 , 0.1% MgSO_4 의 배지조성하에서 재대조 실험을 실시하여 기본배지를 배지조성에 서의 세포생산을 비교하였다.

<49> 도 2는 시간경과에 따른 균체량의 변화를 나타내고 있다. 통계학적 분석에 따른 예측결과와 실제 실험 사이의 밀접한 상관관계는 반응표면 모델의 정당성 (타당성)과 최적 포인트 존재를 증명하는 것이다. 최적화된 조건 하에서, 균체량은 글루코오스를 사용한 기본배지의 경우보다 늦게 상승하지만 성장단계가 길어 균체량은 더욱 증가되었다. 최적화 조건하에서 발효 20시간 이후에 얻은 균체량은 10.8 g/L이었으며 32시간 이후에 얻은 균체량은 18.76 g/L이었다.

<50> Calado 등은 세포생산을 위한 발효에서 고농도의 글루코오스 농도는 알콜발효를 유발시키기 때문에 세포성장을 억제하게 되어 고농도의 세포를 생산할 수 없다고 보고하였으며, 그리하여, 단가가 저렴한 배지를 선택하여 배지최적화를 실시하게 되어 세포생산을 증가시켰다.

<51> 실시예 2 : 기본배지와 최적화배지에서의 세포벽 내 β -글루칸 (β -glucan) 비교

<52> 상기 실험에서 배양된 배양액을 원심분리기를 이용하여 20분 동안 9000 rpm으로 원심분리하여 세포를 분리하여 회수하였으며 멸균수로 3회 세척한 다음 세척한 세포를 80 °C의 건조기에서 48시간 동안 건조시켰다. 이렇게 회수된 세포를 exo-1,3- β -글루카나제, β -글루코시다아제, 아밀로글루코시다아제와 인버타아제를 함유한 효모 β -글루칸 키트 (메가자임, 아일랜드)를 이용하여 반응시킨 다음 UV/Visible Spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 글루칸의 양과 알파와 β -글루칸의 양은 다음의 식에 따라 계산하였다.

총 글루칸의 양 (%. w/w)	$\Delta A \times F/W \times 90$
알파글루칸의 양 (%. w/w)	$\Delta A \times F/W \times 90$
베타글루칸의 양 (%. w/w)	총 글루칸의 양 - 알파 글루칸의 양

<53>

<54> 여기서, ΔA 는 반응후의 흡광도의 변화량, F는 흡광도를 μg 의 D-글루코오스의 양으로 변화시키는 인자, W는 분석에 사용된 시료의 양을 나타내며, 90의 값은 β -글루칸에서 발생하여 나타나게된 free D-글루코오스의 양을 전환하는 인자를 나타낸다.

<55> Kim (K.S. Kim, et al., 2006; Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*)등은 세포벽 구성성분인 β -글루칸의 조성은 배지의 조성에 큰 영향을 받는다고 보고되었다. 그리하여 생산된 세포의 세포벽의 β -글루칸의 함량을 비교함으로써 당밀과 옥수수 농침액의 영향을 조사하였다. 표 4는 기본배지와 최적화한 배지를 이용하여 생산된 균체에서 β -글루칸의 함량을 비교한 것이며 당밀과 옥수수 농침액에 의한 β -글루칸의 함량의 변화는 거의 없어 세포의 고농도 배양에 적합한 배지임을 나타내었다.

<56> 실시예 3. 2.5L 발효조에서 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) JUL3의 세포생산량을 증가시키기 위한 배양조건 최적화와 연속식 유가식배양

<57> 상기 통계학적 실험 설계에 따라 최적화한 배지조성을 적용시켜 250 mL 삼각플라스크에서 배양한 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 균주를 20시간 동안 30°C, 200 rpm으로 배양하여 2.5L 발효조에 접종하여 교반속도를 200, 250, 300, 350, 400 rpm으로 변화시키면서 56시간 동안 30°C에서 배양하여 세포생산이 가장 많이 증가하는 교반속도를 선택하였다 (도 3).

<58> 세포가 가장 많이 생산된 교반속도는 400 rpm이었으나 350 rpm과 비교할 때, 세포의 건중량의 차이가 1.8 g/L로 근소한 차이를 보이기는 하지만 세포의 고농도 배양과 에너지 측면을 고려할 때, 350 rpm이 더 적당한 교반속도를 나타내었다.

- <59> 상기 통계학적 실험 설계에 따라 최적화된 배지조성을 적용시켜 250 mL 삼각플라스크에서 배양한 사카로마이세스 세레비지에 JUL3 균주를 20시간 동안 30 °C, 200 rpm으로 배양하여 2.5L 발효조에 접종하여 통기량을 1, 2, 3 vvm으로 변화시키면서 56시간 동안 30°C에서 배양하여 세포 생산이 가장 많이 증가하는 통기량을 선택하였다.
- <60> 세포생산에 있어 통기량이 증가할수록 산소의 전달속도가 증가하여 세포의 생산량이 증가하지만, 본 실시예에서는 통기량의 증가함에 따라 나타난 세포생산량은 34.6 g/L ~ 39.3 g/L로 통기량에 의한 영향은 굉장히 적게 나타났다 (도 4).
- <61> 상기 실험에서 나타난 세포의 최적생산 조건을 바탕으로 당밀을 부가적으로 공급하여 영양소를 제공할 수 있다면 세포의 생산을 극대화시킬 수 있다는 가정아래 일정한 농도의 당밀을 공급하여 배지 내 일정한 기질농도를 유지시킬 수 있는 유가식 배양을 수행하였다. 세포생산에 있어서 유가식 배양은 기질을 효과적으로 미생물에게 공급해주어 세포의 생산성을 증가시킬 수 있는 고도의 방법이다. 이에 농도에 의해 세포의 생산을 억제하며 고가인 글루코오스를 대체 할 수 있는 당밀을 사용하여, 배지 내 글루코오스의 양을 최소화 하여 기질을 공급, 세포의 고농도 배양을 수행하였다. 배양조건은 당밀의 첨가 외에 상기실험의 조건과 동일하게 하였다. 당밀은 사카로마이세스 세레비지에 JUL3의 지수성장기인 배양 후 18시간 후에 세포의 성장속도와 기질소모속도를 고려하여 30%, 50%, 75%의 농도조성과 유속 10 mL/h와 20 ml/h를 변화시키면서 공급하여 세포생산량을 비교하였다.
- <62> 도 5에서 보듯이, 80시간 동안 발효하여 95.7 g/L을 생산하여 기존의 회분식배양과 비교할 때 회분식 배양에서 생산된 세포보다 약 2.44배의 생산성 증가를 나타내었다.

발명의 효과

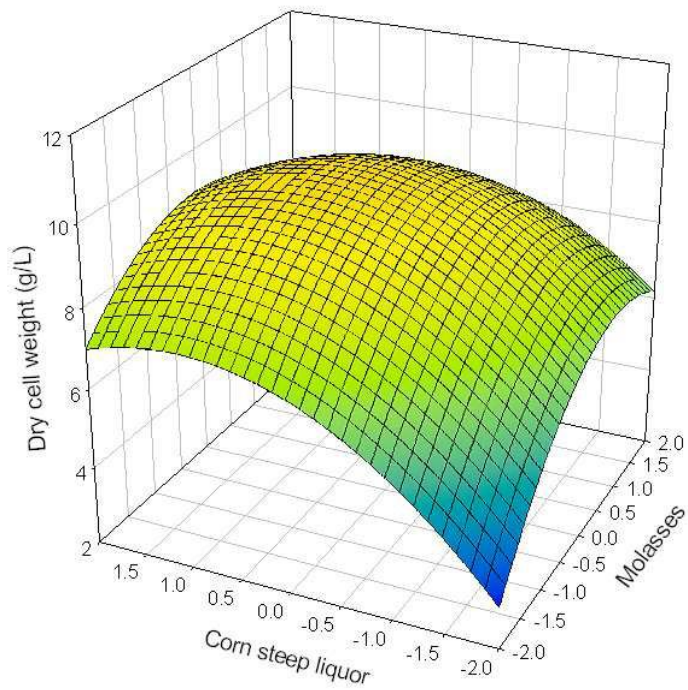
- <63> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 통계학적 최적화 방법과 발효조의 배양조건 확립 및 유가식 배양의 최적화에 의해 개량된 돌연변이체인 사카로마이세스 세레비지에 JUL3의 세포를 대량생산하는 방법에 관한 것으로 통계학적 실험설계(Experimental design)를 통해 세포생산의 최적 조건을 확립하여 세포의 대량생산하는 방법을 제공하는데 뛰어난 효과가 있다. 특히 본 발명은 통계학적 분석방법을 통하여 얻은 세포생산의 최적조건을 바탕으로 2.5L의 발효조에서 세포생산의 주된 영향을 주는 공정변수인 교반속도와 통기량의 최적화를 통해 세포생산을 증가시키는 방법을 제공하였으며, 대량생산에 필요한 Scale-up에 필요한 자료를 제공하며 유가식 배양에서 세포생산 극대화시킬 수 있는 공정변수인 기질유입속도 (feed rate)와 기질조성을 확립하여 대량생산에 필요한 정보를 제공하는데 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 방법에 따라 대량생산되는 세포는 낮은 수율을 보이는 추출, 정제공정의 단점을 보완하여 대량생산될 수 있어 사료나 기능성 건강식품생산에 적합한 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

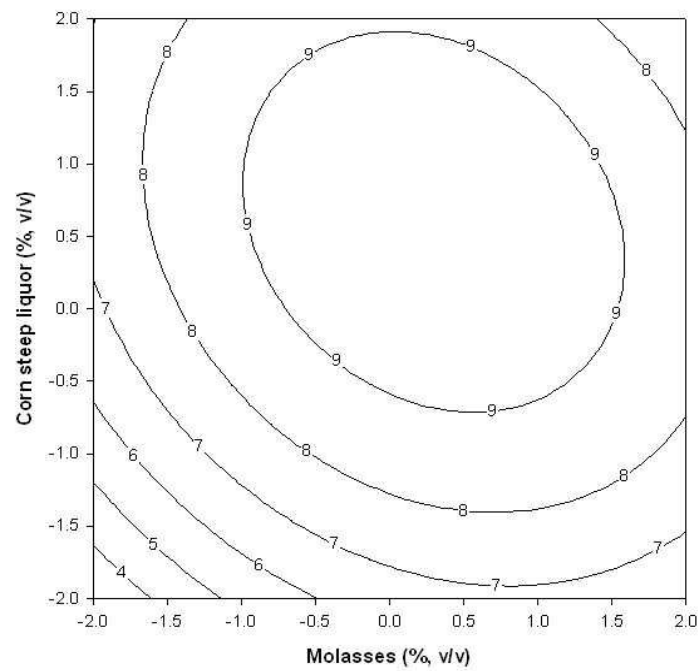
- <1> 도 1은 반응표면의 중앙혼합 설계 실험에 의해 최적화된 3차원 반응표면과 등고선을 도시한 그래프이다.
- <2> 도 2는 시간의 경과에 따라 기본배지와 값 싼 배지인 당밀과 옥수수 농침액의 성분을 최적화한 배지의 세포의 생산량을 비교한 성장곡선을 도시한 그래프이다.
- <3> 도 3는 2.5L 발효조에서 플라스크에서 최적화한 배지성분을 적용하여 세포 생산을 높이기 위해 교반속도의 영향을 도시한 그래프이다.
- <4> 도 4는 2.5L 발효조에서 세포생산 높이기 위해 통기량의 영향을 도시한 그래프이다.
- <5> 도 5는 2.5L 발효조에서 최적화한 배지조성과 배양조건을 바탕으로 유가식배양에 필요한 기질의 유입속도와 농도를 최적화한 것을 도시한 그래프이다.

도면

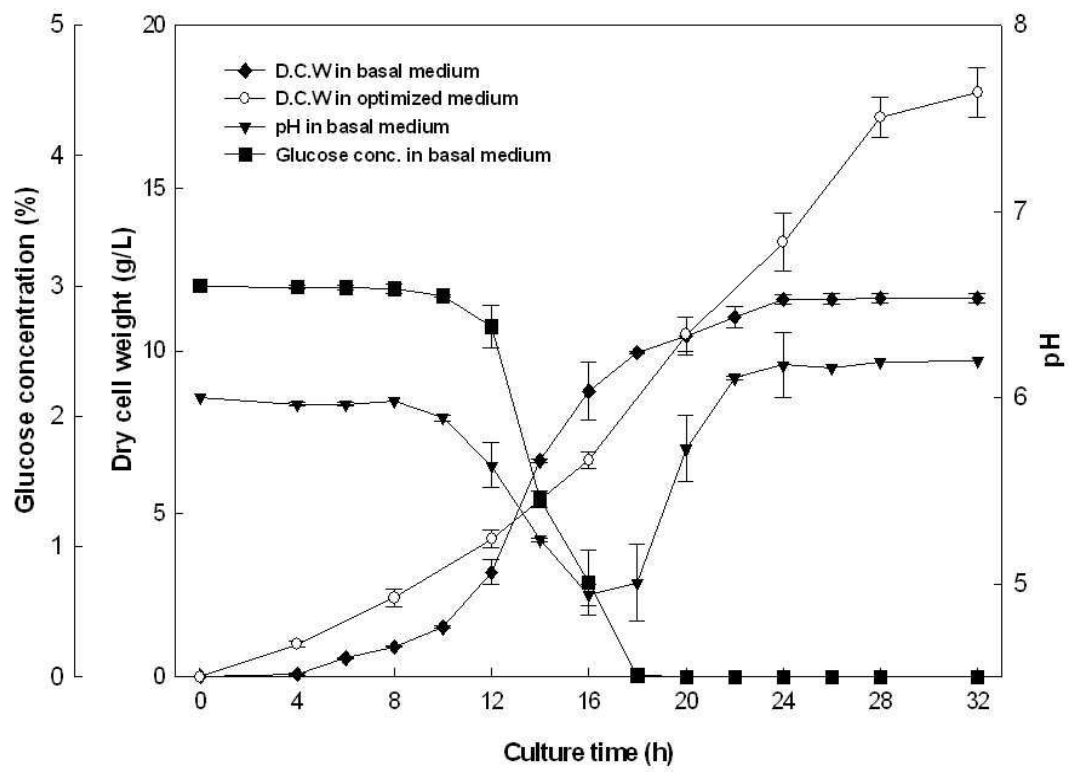
도면1a



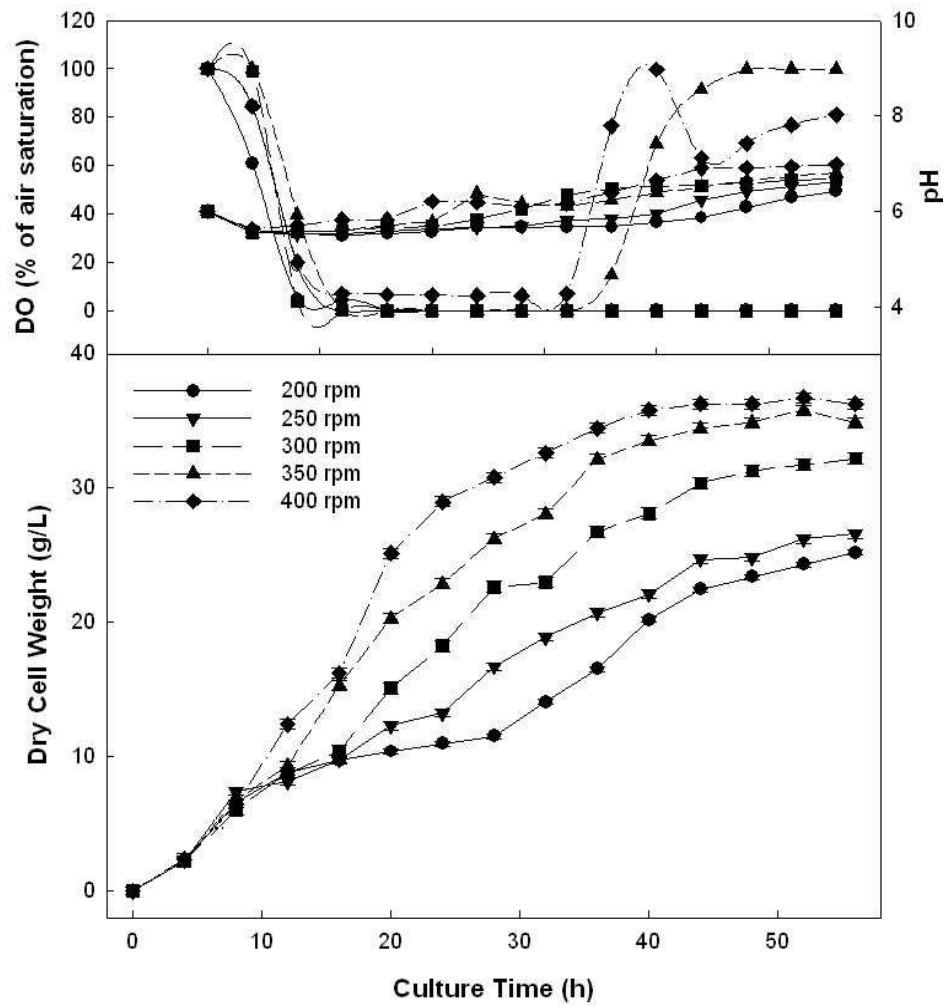
도면1b



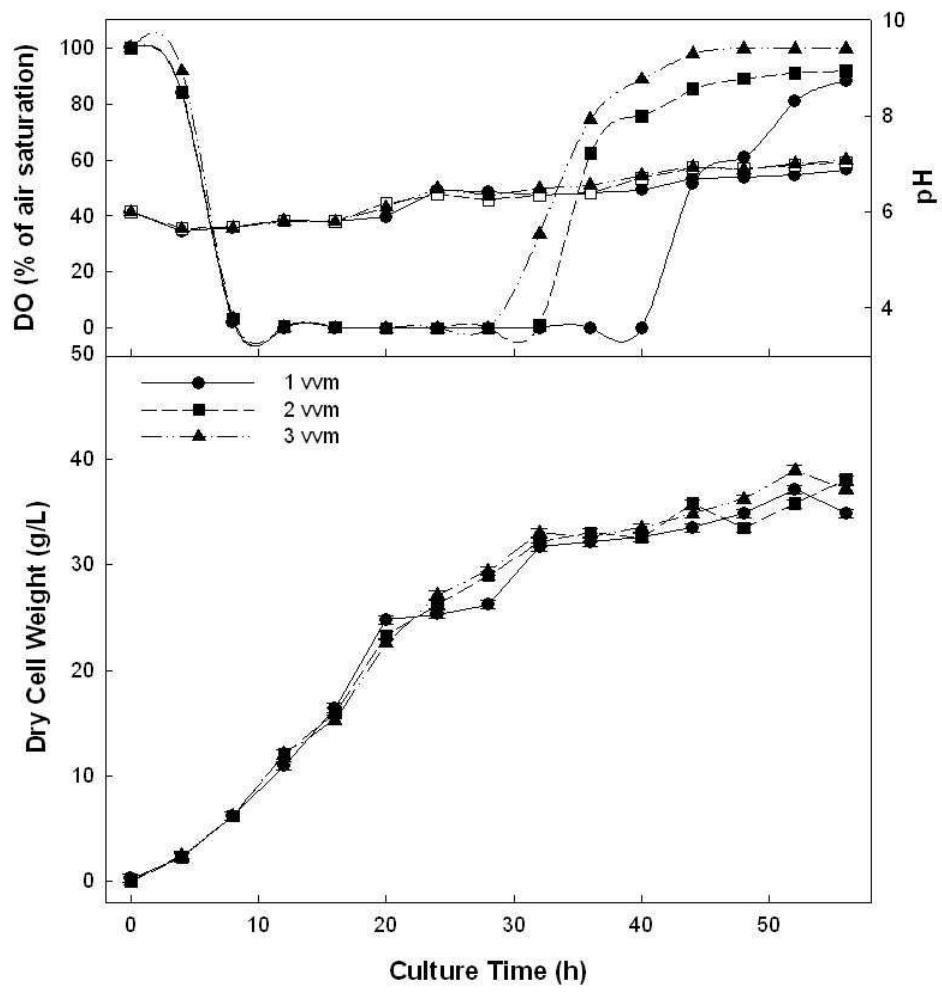
도면2



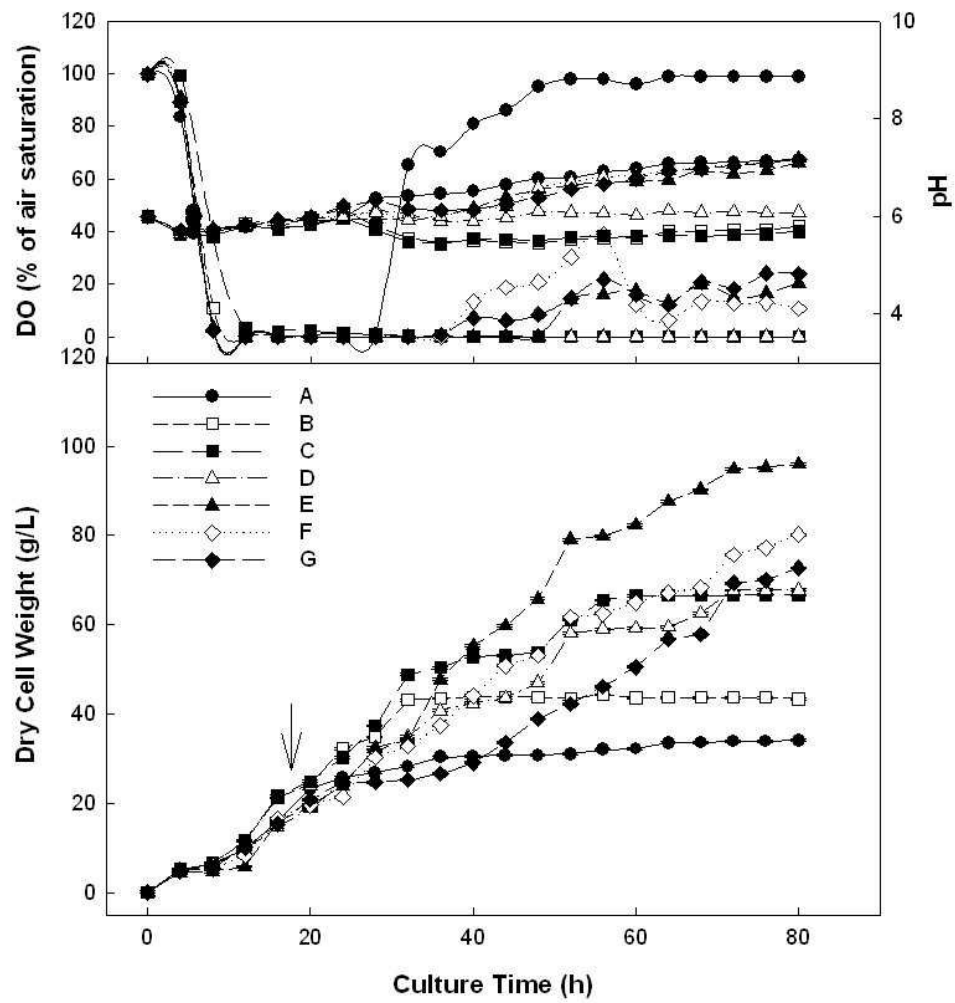
도면3



도면4



도면5



- A: 75% molasses, 20mL/h
 B: 75% molasses, 15mL/h
 C: 75% molasses, 10mL/h
 D: 50% molasses, 20mL/h
 E: 50% molasses, 10mL/h
 F: 30% molasses, 20mL/h
 G: 30% molasses, 10mL/h