

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 3월 26일 (26.03.2020) WIPO | PCT

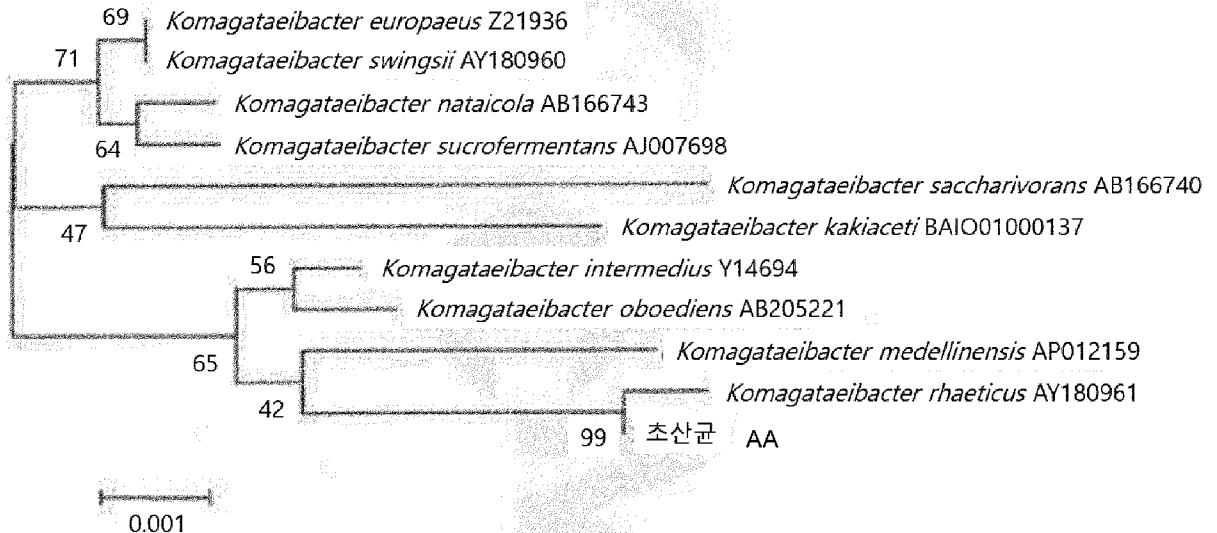


(10) 국제공개번호
WO 2020/060165 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) A45D 44/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01) A61K 8/02 (2006.01)
C08J 5/18 (2006.01) A61K 8/73 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/012010
- (22) 국제출원일: 2019년 9월 17일 (17.09.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0111101 2018년 9월 17일 (17.09.2018) KR
- (71) 출원인: 에스케이바이오랜드 주식회사 (SK BIOLAND CO., LTD.) [KR/KR]; 31257 충청남도 천안시 동남구 병천면 송정리2길 59, Chungcheongnam-do (KR). 에스케이바이오랜드 해문지사 (SK BIOLAND HAIMEN CO., LTD.) [CN/CN]; 강소성 해문시 린장신구 텐무후로 1호, Jiangsu (CN).
- (72) 발명자: 박지호 (PARK, Ji Ho); 22505 인천시 동구 화도진로 187(만석동, 만석비치타운 주공아파트) 103동 1001호, Incheon (KR). 권민영 (KWON, Min Young); 15062 경기도 시흥시 중심상가로 345(정왕동) 910-904, Gyeonggi-do (KR). 김태현 (KIM, Tae Hyun); 15571 경기도 안산시 상록구 샘골로3길 2(본오동) 102호, Gyeonggi-do (KR). 김기수 (KIM, Ki Soo); 강소성 해문시 린장신구 텐무후로 1호, Jiangsu (CN). 이재우 (LEE, Jae Woo); 강소성 해문시 린장신구 텐무후로 1호, Jiangsu (CN). 이여준 (LEE, Yeo Choon); 강소성 해문시 린장신구 텐무후로 1호, Jiangsu (CN).
- (74) 대리인: 윤대웅 (YOON, Dae Woong); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922, 603호, Seoul (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,

(54) Title: COMPOSITION FOR CULTURING STRAIN FOR PRODUCING BACTERIAL CELLULOSE

(54) 발명의 명칭: 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 조성물



AA ... Acetic acid bacteria

(57) Abstract: The present invention provides a composition for culturing a strain for producing bacterial cellulose. Compared to *Acetobacter xylinum*, which is conventionally known as the microorganism with the best production yield of cellulose, a *Komagataeibacter rhaeticus* KOSS-15 strain cultured in a composition of the present invention exhibits high cellulose productivity while enabling the amount of a saccharide source necessary for producing a cellulose sheet of the same weight to be reduced by 5-6 times.

(57) 요약서: 본 발명은 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에 코마가테이박터 래티커스(*Komagataeibacter rhaeticus*) KOSS15 균주를 배양하는 경우, 종래 셀룰로오스의 생산 수율이 가장 우수한 미생물로 알려진 아세트박터 자일리넴과 비교하여 동일한 중량의 셀룰로오스 시트를 제조하는데 필요한 당원의 함량을 5-6배 절감할 수 있는 높은 셀룰로오스 생산능을 나타낸다.

[다음 쪽 계속]

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:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 조성물 기술분야

- [1] 본 특허출원은 2018년 9월 17일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2018-0111101호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 조성물에 관한 것이다.
- [3]

배경기술

- [4] 화장품 분야에서 사용되는 시트(sheet) 타입의 마스크는 크게, (i) 코튼 및 펄프와 같은 식물성 셀룰로오스 섬유나 나일론 및 듀폰과 같은 합성 섬유로 만든 부직포를 화장유액의 담수체에 담가 마스크 모양의 지지체로 사용하는 셀룰로오스 마스크, (ii) 천연 아가(agar), 카라기난, 로커스트빈검과 같은 천연 다당체로 만든 하이드로겔마스크, 및 (iii) 미생물 배양을 통해 만들어진 박테리아 셀룰로오스(bacterial cellulose, biocellulose)를 이용하여 화장품용 담수체에 담가 마스크 모양의 지지체로 사용하는 박테리아 셀룰로오스 마스크의 3가지 타입이 있다.
- [5] 이처럼 화장품 분야에서 사용되는 시트 타입의 마스크팩은 손으로 바를 필요 없이 얼굴 형태로 제작된 시트를 붙이는 것으로서 가장 큰 장점으로 보습 및 청정 효과 등을 얻을 수 있기 때문에 화장품 시장에서의 각광을 받고 있다.
- [6] 미생물 배양을 통해 만들어진 셀룰로오스(일명, 박테리아 셀룰로오스)는 의약품용 화상치유제나 화장용 마스크 팩의 소재로 최근 들어 그 활용도가 높아지고 있다. 셀룰로오스는 자연계에 가장 풍부한 생체물질 자원이며 특히, 초산균이 생성하는 셀룰로오스는 식품의 첨가제뿐만 아니라 고부가가치의 산업용 신소재로 많은 주목을 받고 있다. 또한, 박테리아가 생성하는 셀룰로오스는 식물체가 생성하는 셀룰로오스와 달리 물리화학적 성질이 뛰어나다.
- [7] 일반적인 박테리아 셀룰로오스의 제조는 주로 감귤 착즙과 같은 과일주스의 배양액에서의 균체 배양을 통해서 이루어진다. 박테리아 셀룰로오스의 생산 균주로 아세토박터(Acetobacter)속, 라이조비움(Rhizobium)속, 그리고 아그로박터(Agrobacterium)속 등이 있으며, 생산수율이 우수한 균주로 아세토박터 자일리눔이 가장 많이 알려져 있다(한국등록특허 제10-0405776호)이다.
- [8] 이러한 박테리아 셀룰로오스를 생산하는 미생물의 셀룰로오스 생산 효율은 그 배양 배지의 구성에 영향을 받으며, 따라서, 미생물의 셀룰로오스 생산효율을 향상시킬 수 있는 배양용 조성물의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명자들은 박테리아의 셀룰로오스 생산효율을 향상시킬 수 있는 배양용 조성물을 개발하고자 새로운 균주의 발굴 및 배양액의 당원에 따른 박테리아 셀룰로오스의 품질 및 생산 효율 변화를 연구하였다. 그 결과, 신규한 코마가테이박터 래티커스(*Komagataeibacter rhaeticus*) KOSS15 균주를 동정하고, 상기 균주가 꿀을 당원으로 하는 배양 배지에서 배양되는 경우에 높은 셀룰로오스 생산능을 가짐을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [11] 따라서, 본 발명의 목적은 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 꿀, 또는 포도당 및 과당의 당원; 및 (b) 프롤린을 포함하는 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 조성물을 제공한다.
- [15] 본 발명자들은 박테리아의 셀룰로오스 생산효율을 향상시킬 수 있는 배양용 조성물을 개발하고자 새로운 균주의 발굴 및 배양액의 당원에 따른 박테리아 셀룰로오스의 품질 및 생산 효율 변화를 연구하였다. 그 결과, 신규한 코마가테이박터 래티커스(*Komagataeibacter rhaeticus*) KOSS15 균주를 동정하고, 상기 균주가 꿀을 당원으로 하는 배양 배지에서 배양되는 경우에 높은 셀룰로오스 생산능을 가짐을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [16] 본 명세서에서 용어 "셀룰로오스(cellulose)"는 β -D-글루코오스가 글루코시드 결합을 통해 중합체를 이루고, 화학식은 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 이고, 단위체는 셀로비오스(cellobiose)인 다당류를 의미한다.
- [17] 본 명세서에서 용어 "박테리아 셀룰로오스"는 박테리아의 배양에 의해 제조된 셀룰로오스를 의미한다.
- [18] 본 명세서에서 용어 "꿀"은 꿀벌들이 식물의 밀선(蜜腺)에서 수집한 점도성 있는 물질로서 높은 함량의 포도당, 과당을 포함하며 이외에 다양한 비타민, 단백질, 미네랄 성분을 포함하는 물질을 의미한다.
- [19] 본 발명의 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물은 당원을 포함한다.
- [20] 본 발명은 (a) 꿀, 또는 (b) 포도당 및 과당을 당원으로 포함하는 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 꿀은 사탕꿀, 아카시아꿀, 또는

야생화꿀(잡꿀)이다.

- [22] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 당원의 종류 및 농도는 (a) 꿀 0.1~5 부피(v/v) 또는 (b) 포도당 및 과당 0.1~5 중량%(w/v)이다.
- [23] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 배지 조성물은 꿀을 0.1~5 부피%, 0.1~4 부피%, 0.1~3 부피%, 0.1~2.5 부피%, 0.1~2 부피%, 0.1~1.5 부피%, 또는 0.1~1부피%의 농도로 포함한다.
- [24] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 배지 조성물은 꿀을 0.1 내지 3.0 부피%, 0.2 내지 3.0 부피%, 0.3 내지 3.0 부피%, 0.4 내지 3.0 부피%, 0.5 내지 3.0 부피%, 0.6 내지 3.0 부피%, 0.7 내지 3.0 부피%, 0.8 내지 3.0 부피%, 0.9 내지 3.0 부피%, 1 내지 3.0 부피%, 0.1 내지 2.0 부피%, 0.2 내지 2.0 부피%, 0.3 내지 2.0 부피%, 0.4 내지 2.0 부피%, 0.5 내지 2.0 부피%, 0.6 내지 2.0 부피%, 0.7 내지 2.0 부피%, 0.8 내지 2.0 부피%, 0.9 내지 2.0 부피%, 0.1 내지 1.9 부피%, 0.1 내지 1.8 부피%, 0.1 내지 1.7 부피%, 0.1 내지 1.6 부피%, 0.1 내지 1.5 부피%, 0.1 내지 1.4 부피%, 0.1 내지 1.3 부피%, 0.1 내지 1.2 부피%, 0.1 내지 1.1 부피%, 0.2 내지 1.8 부피%, 0.2 내지 1.6 부피%, 0.2 내지 1.4 부피% 또는 0.2 내지 1.2 부피% 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [25]
- [26] 본 발명의 다른 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 배지 조성물은 포도당 및 과당을 도합 0.1~5 중량%, 0.1~4 중량%, 0.1~3 중량%, 0.1~2.5 중량%, 0.1~2 중량%, 0.1~1.5 중량%, 또는 0.1~1중량%의 농도로 포함한다.
- [27] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 배지 조성물은 포도당 및 과당을 도합 0.1 내지 3.0 중량%, 0.2 내지 3.0 중량%, 0.3 내지 3.0 중량%, 0.4 내지 3.0 중량%, 0.5 내지 3.0 중량%, 0.6 내지 3.0 중량%, 0.7 내지 3.0 중량%, 0.8 내지 3.0 중량%, 0.9 내지 3.0 중량%, 1 내지 3.0 중량%, 0.1 내지 2.0 중량%, 0.2 내지 2.0 중량%, 0.3 내지 2.0 중량%, 0.4 내지 2.0 중량%, 0.5 내지 2.0 중량%, 0.6 내지 2.0 중량%, 0.7 내지 2.0 중량%, 0.8 내지 2.0 중량%, 0.9 내지 2.0 중량%, 0.1 내지 1.9 중량%, 0.1 내지 1.8 중량%, 0.1 내지 1.7 중량%, 0.1 내지 1.6 중량%, 0.1 내지 1.5 중량%, 0.1 내지 1.4 중량%, 0.1 내지 1.3 중량%, 0.1 내지 1.2 중량%, 0.1 내지 1.1 중량%, 0.2 내지 1.8 중량%, 0.2 내지 1.6 중량%, 0.2 내지 1.4 중량% 또는 0.2 내지 1.2 중량% 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [28] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 배지조성물은 포도당 및 과당을 2:3의 중량 비율로 포함한다. 상기 2:3의 비율은 로얄젤리에 포함된 포도당 및 과당의 비율에서 도출한 것이다.
- [29] 또한, 본 발명의 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물은 프롤린을 추가적으로 포함한다. 상기 프롤린은 본 발명의 배지 조성물에 0.01 내지 1.0 중량%, 0.02 내지 1.0 중량%, 0.03 내지 1.0 중량%, 0.04 내지 1.0 중량%, 0.05 내지 1.0 중량%, 0.06 내지 1.0 중량%, 0.07 내지 1.0 중량%, 0.08 내지 1.0 중량%, 0.01 내지 0.8 중량%, 0.01 내지 0.6 중량%, 0.01 내지 0.4 중량%, 0.01 내지

- 0.2 중량%, 0.02 내지 0.6 중량%, 0.03 내지 0.6 중량%, 0.04 내지 0.6 중량%, 0.05 내지 0.4 중량%, 0.06 내지 0.3 중량%, 0.04 내지 0.3 중량%, 0.04 내지 0.2 중량% 또는 0.05 내지 0.15 중량% 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [30] 상기 과당, 포도당 및 프롤린은 로알젤리를 구성하는 주요당 및 아미노산으로, 코마가테이박터 래티커스 KOSS15 균주의 배양에 있어 꿀 대신 로알젤리를 구성하는 주요당 및 아미노산(프롤린)을 첨가하여 박테리아 셀룰로오스를 제조할 수 있다.
- [31] 본 발명의 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물은 상술한 성분 이외에 탄소원, 질소원 및 인(phosphorus)원을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [32] 상기 탄소원은 에탄올, 글루코스, 수크로스, 프룩토스, 갈락토오스, 솔루블스타크, 이노시톨, 글리세롤, 자일로스, 텍스트로스, 락토오스, 텍스트린, 아도니톨, 만니톨, 만노스, 말토오스 및 라피노스로 이루어지는 군 중에서 선택된 하나 이상의 탄소원을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [33] 상기 질소원은 효모 추출물, 펩톤, 소이톤, 카사미노산, 트립톤 및 맥아 추출물을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유기 질소원, NH_4Cl , $(\text{COONH}_4)_2$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 무기 질소원을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [34] 상기 인원은 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨, 인산이수소나트륨 및 인산수소이나트륨을 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인원을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [35] 상기 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물은 미량요소를 첨가하기 위하여, MgSO_4 , CaCl_2 , KCl , BaCl_2 , Li_2SO_4 , MnSO , MnSO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 , Na_2MoO_4 , KH_2PO_4 및 FeCl_3 을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [36] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 배지는 셀룰라아제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 셀룰라아제는 셀룰로오스 생산 균주의 배양시 펠리클(pellicle)이 생기는 현상을 방지하기 위해 첨가되는 것이며, 아세토박터 자일리넴 IFO13693의 배양시에는 셀룰라아제를 첨가하면 불량시트가 생성되어 적용될 수 없으나, 본 발명의 코마가테이박터 래티커스 KOSS15 균주의 경우 펠리클(pellicle)이 생기는 현상을 방지할 수 있고, 시트의 품질에 더 우수해진다.
- [37] 본 발명에 있어서, 상기 셀룰라아제를 포함하는 배지 조성물은 셀룰로오스 생산균주의 전배양을 위해 사용될 수 있다.
- [38] 본 명세서에서 용어, “전배양”이란, 셀룰로오스 생산 균주를 활성화 또는 증균시키기 위하여 스타킹된 셀룰로오스 생산 균주를 비교적 소량의 규모(예컨대 100 L 이하)로 배양하는 단계를 의미한다.
- [39] 상기 전배양 배지는 셀룰라아제를 0.0005 내지 0.05 중량%, 0.001 내지 0.05 중량%, 0.003 내지 0.05 중량%, 0.001 내지 0.03 중량%, 0.001 내지 0.02 중량% 또는 0.001 내지 0.01 중량% 포함할 수 있다.

- [40] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 있어서, 상기 전배양 배지(증균용 배지) 조성물은 효모추출물 0.1 내지 10.0 중량%, MgSO_4 0.002 내지 0.2 중량%, CaCl_2 0.002 내지 0.2 중량%, 에탄올 0.2 내지 20.0 중량% 및 셀룰라아제 0.0005 내지 0.05 중량% 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [41] 상기 전배양 배지는 에탄올을 0.2 내지 20.0 중량%, 0.5 내지 20.0 중량%, 1.0 내지 20.0 중량%, 1.5 내지 20.0 중량%, 1.0 내지 20.0 중량%, 1.0 내지 17.0 중량%, 1.0 내지 14.0 중량%, 1.0 내지 11.0 중량%, 1.0 내지 8.0 중량%, 1.0 내지 5.0 중량% 또는 1.0 내지 3.0 중량% 포함할 수 있다.
- [42]
- [43] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물은 MgSO_4 , CaCl_2 , 초산나트륨 및 초산, 또는 이들의 조합을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [44] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 있어서, 상기 배지는 박테리아 셀룰로오스 시트의 본배양 또는 시트전환배양(시트 생산)용도로 사용될 수 있다.
- [45] 본 명세서에서 용어, “본배양”이란 “전배양”된 배양액을 실제 박테리아 셀룰로오스 시트를 생산하는 “시트전환 배양” 바로 전 단계에 이르기 까지 박테리아 셀룰로오스 생산 균주를 대규모(예컨대 500 L 이상 50,000 L 이하)로 배양하는 단계를 의미한다.
- [46] 본 명세서에서 용어 “시트전환 배양”은 박테리아 셀룰로오스 생산 균주를 포함하는 본배양액을 정치 배양하여 박테리아 셀룰로오스 생산 균주가 박테리아 셀룰로오스 시트를 생산하는 단계를 의미한다.
- [47] 상기 조성물은 MgSO_4 을 0.002 내지 0.2 중량%, 0.005 내지 0.2 중량%, 0.008 내지 0.2 중량%, 0.01 내지 0.2 중량%, 0.013 내지 0.2 중량%, 0.015 내지 0.2 중량%, 0.01 내지 0.15 중량%, 0.01 내지 0.1 중량%, 0.01 내지 0.05 중량, 0.01 내지 0.03 중량% 또는 0.015 내지 0.03 중량% 포함할 수 있다.
- [48] 상기 조성물은 CaCl_2 을 0.002 내지 0.2 중량%, 0.005 내지 0.2 중량%, 0.008 내지 0.2 중량%, 0.01 내지 0.2 중량%, 0.013 내지 0.2 중량%, 0.015 내지 0.2 중량%, 0.01 내지 0.15 중량%, 0.01 내지 0.1 중량%, 0.01 내지 0.05 중량, 0.01 내지 0.03 중량% 또는 0.015 내지 0.03 중량% 포함할 수 있다.
- [49] 상기 조성물은 초산나트륨을 0.01 내지 1.0 중량%, 0.02 내지 1.0 중량%, 0.03 내지 1.0 중량%, 0.04 내지 1.0 중량%, 0.05 내지 1.0 중량%, 0.06 내지 1.0 중량%, 0.07 내지 1.0 중량%, 0.08 내지 1.0 중량%, 0.01 내지 0.8 중량%, 0.01 내지 0.6 중량%, 0.01 내지 0.4 중량%, 0.01 내지 0.2 중량%, 0.02 내지 0.6 중량%, 0.03 내지 0.6 중량%, 0.04 내지 0.6 중량%, 0.05 내지 0.4 중량%, 0.06 내지 0.3 중량%, 0.04 내지 0.3 중량%, 0.04 내지 0.2 중량% 또는 0.05 내지 0.15 중량% 포함할 수 있다.
- [50] 상기 조성물은 초산을 0.02 내지 2.0 중량%, 0.05 내지 2.0 중량%, 0.1 내지 2.0 중량%, 0.15 내지 중량%, 0.1 내지 1.5 중량%, 0.1 내지 1.0 중량% 또는 0.1 내지 0.5 중량% 포함할 수 있다.

- [51] 본 발명의 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 조성물은 셀룰로오스 생산능을 갖는 박테리아를 배양함으로써 박테리아 셀룰로오스를 제조할 수 있다.
- [52] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 박테리아는 수탁번호 KCCM12270P인 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15 균주이다. 상기 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15 균주는 홍차버섯종균(*kombucha*) 유래이다.
- [53] 홍차버섯종균은 곰부차, 홍차버섯효모, 홍버섯, 장수버섯 등 여러 이름으로 불리며, 박테리아와 효모가 실 같은 군사를 모체로 공생하는 유기산생성균(유산균)의 일종이다. 홍차버섯종균은 아세트박터 자일리눔(*A. xylinum*)과 같은 효모에 의해 생성된 알코올을 아세트산 및 다른 산으로 발효시켜 산성을 증가시키는 박테리아 및 브레타노마이세스(*Brettanomyces*), 자이고사카로마이세스(*Zygosaccharomyces*), 칸디다(*Candida*), 스킨조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*) 및 사카로마이세스(*Saccharomyces*)와 같은 효모의 공생체이다.

[54]

발명의 효과

- [55] 본 발명은 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물에 코마이가테이박터 래티커스(*Komagataeibacter rhaeticus*) KOSS15 균주를 배양하는 경우, 종래 셀룰로오스의 생산 수율이 가장 우수한 미생물로 알려진 아세트박터 자일리눔과 비교하여 동일한 중량의 셀룰로오스 시트를 제조하는데 필요한 당원의 함량을 5-6배 절감할 수 있는 높은 셀룰로오스 생산능을 나타낸다.

[56]

도면의 간단한 설명

- [57] 도 1은 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15 균주의 계통수를 나타낸다.
- [58] 도 2는 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15 균주를 이용한 셀룰로오스 제조과정을 나타낸다.
- [59] 도 3은 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15 균주의 계대 배양을 통한 셀룰로오스시트의 제조과정을 모식도로 나타낸다.
- [60] 도 4는 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15 균주의 배양을 통해 제조한 셀룰로오스 시트를 나타낸다.
- [61] 도 5는 셀룰라아제 처리에 따른 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15 및 아세트박터 자일리눔 IFO13693의 셀룰로오스 시트를 나타낸다.
- [62] 도 6은 배지 내 꿀 농도에 따른 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15에 의해 제조된 셀룰로오스 시트의 이미지를 나타낸다.
- [63] 도 7은 배지 내 꿀 종류에 따른 코마이가테이박터 래티커스 KOSS15에 의해 제조된 셀룰로오스 시트의 이미지를 나타낸다.

[64]

발명의 실시를 위한 형태

[65]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[66]

[67]

실시예

[68]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[69]

[70]

본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[71]

[72]

1. 균주 선별

[73]

물 1L에 현미녹차 3팩을 우려내어 설탕을 30%(w/v) 첨가하고, 플라스크에 500 ml씩 분주한 다음, 121°C에서 30분간 멸균 및 냉각하였다. 입수한 홍차버섯종균액 5종류(베트남 홍차버섯; 지리산 녹차 홍차버섯; 보성녹차 홍차버섯; 중국 운남성 홍차버섯; 티벳 홍차 버섯)를 각각 10%(v/v) 접종하여 인큐베이터에서 28°C 조건에서 정치 배양하였다. 배양 2주부터 셀룰로오스가 형성되는 것을 확인한 후, 한 개의 실험구에서 균을 취하여 포도당 2%, 효모 추출물 1%, 황산마그네슘 0.02%, 염화칼슘 0.02% 및 한천 1.8%를 첨가하였다. 초산으로 배지의 pH가 4.0이 되도록 조절한 후, 한천배지를 제조하였다. 한천배지의 5개액 중 선발된 한 개의 액(지리산 녹차 홍차버섯)을 0.1 ml 도말하여 28°C에서 7일 동안 배양하였다. 형태와 균모양이 동일한 콜로니를 6개 그룹으로 분리한 후 60 ml의 포도당 2%, 효모 추출물 1%, 황산마그네슘 0.02% 및 염화칼슘 0.02%를 포함하는 배지 액을 멸균하였다. 그 후, 멸균한 배지액을 10 ml씩 분주하고, 여기에 6개의 콜로니를 각각 접종하였다.

[74]

28°C에서 3일간 배양한 후, 40 ml에 초산 전배양 배지를 만들고 3일 배양한 4 ml의 액을 초산 전배양 배지에 넣고 28°C에서 정치배양하여 4일 후 셀룰로오스가 형성되는 형태를 관찰하였다. 최종적으로, 셀룰로오스 형태가 양호한 콜로니를 표시하고 균 스타크를 제조하였다. 6개의 실험구 중 가장 형성이 잘된 콜로니를 칭하여 KOSS15로 명명하고 한국미생물보존센터에 특허기탁하여 수탁번호 KCCM12270P를 부여받았다.

[75]

[76] 2. 균주 배양

[77] (1) 아세트박터 자일리넴 (*Acetobactorxylinum*) IFO13693 균주의 배양

[78] 1) 전배양(1세대)

[79] 코마가테이박터 래티커스 KOSS15의 셀룰로오스 생물 전환 효율을 비교하기

위한 대조군으로 아세트박터 자일리넴(*Acetobactor xylinum*)IFO13693를
이용하였다. 상기 아세트박터 자일리넴은 대표적인 셀룰로오스 생산 균주이다.

[80] 포도당 2%, 효모추출물 1.0%, $MgSO_4$ 0.02%, $CaCl_2$ 0.02% 및 에탄올 2%를

포함하는 배양배지에 아세트박터 자일리넴 IFO13693를 2.0×10^7 CFU/ml로
접종하여 Flask에서 30°C하에 160 rpm으로 교반하며 48 시간 동안 전배양하였다.

[81]

[82] 2) 본배양(2세대)

[83] 이어서 전배양물에서 생성된 슬러리(찌꺼기)를 80 mesh의 체로 여과하고

본배양액 대비 10%를 접종하였다. 상기 본배양 배지는 포도당 3%,
MSG(monosodium glutamate) 0.5%, $MgSO_4$ 0.02%, $CaCl_2$ 0.02%, 초산나트륨 0.1%
및 초산 0.2%를 첨가하여 제조하였다. 상기 본배양은 0 rpm, 0.3 vvm (aeration
volume/medium volume/minute)의 조건으로 48시간 동안 정치배양 하였다.

[84]

[85] 3) 시트전환 배양(본배양액 혼합 및 트레이 분주) 및 세척

[86] 마지막으로, 아세트박터 자일리넴 IFO13693의 상기 본배양물을 배양배지 대비
5-10% 접종 및 혼합하여 트레이에 분주하고 0 rpm 및 0.3 vvm 조건에서 3일 동안
정치 배양하여 셀룰로오스 시트 전환을 유도하였다(도 2 및 3). 배양이 끝난 후
제조된 셀룰로오스 시트를 탈수시킨 뒤, NaOH 0.1%를 처리하여 여분의 균주를
제거하고 세척하였다. 그 다음 과탄산나트륨 5%를 처리하여 단백질 및 불순물을
제거하고 세척하여 시트를 수득하였다(도 4).

[87]

[88] (2) 코마가테이박터 래티커스 KOSS15 (KCCM12270P)의 배양

[89] 1) 전배양(1세대)

[90] 당원(과당 0.6% 및 포도당 0.4%; 또는 꿀 1%), 효모추출물 1.0%, $MgSO_4$ 0.02%,
 $CaCl_2$ 0.02%, 에탄올 2% 및 셀룰라아제 0.005%를 포함하는 배양배지에
코마가테이박터 래티커스 KOSS15를 1.0×10^8 CFU/ml로 접종하여 Flask에서 30°C
하에 80-160 rpm으로 교반하며 48 시간 동안 전배양하였다. 상기 셀룰라아제는
전배양 시 펠리클(pellicle)이 생기는 현상을 방지하기 위해 첨가하였으며, 상기
(1)의 아세트박터 자일리넴 IFO13693의 전배양 배지에는 셀룰라아제를
첨가하는 경우에 불량시트가 생성되어 적용하지 않았다(도 5).

[91]

[92] 2) 본배양(2세대)

[93] 다음으로 전배양물을 본배양 배지 대비 10% 접종하였다. 상기 본배양 배지는

당원(과당 0.6% 및 포도당 0.4%; 또는 꿀 1%), 프롤린 0.1%, MgSO_4 0.02%, CaCl_2 0.02%, 초산나트륨 0.1% 및 초산 0.2%를 첨가하여 제조하였다. 상기 본배양은 80 rpm, 0.3 vvm 의 조건으로 48시간 동안 교반 배양하였다.

[94]

[95] 3) 시트전환 배양(본배양액 혼합 및 트레이 분주) 및 세척

[96] 마지막으로 코마가테이박터 래티커스 KOSS15의 본배양물을 배양배지 대비 5-10% 접종 및 혼합하여 트레이에 분주하고 0 rpm 및 0.3 vvm 조건에서 2일 동안 정지 배양하여 셀룰로오스 시트 전환을 유도하였다(도 2 및 3). 배양이 끝난 후, NaOH 0.1%를 하룻밤(overnight) 처리하여 여분의 균주를 제거하고 탈수시킨 뒤 세척하였다. 이어서 과탄산나트륨 5%를 처리하여 단백질 및 불순물을 제거하고 세척하여 시트를 수득하였다(도 4). 상기 코마가테이박터 래티커스 KOSS15이 생산한 셀룰로오스 시트는, 아세토박터 자일리넴 IFO13693이 생산한 셀룰로오스 시트와 달리, 시트를 탈수하기 전에 NaOH 수용액에 먼저 침지하는 경우 시트가 단단해지면서 강도가 우수해진다는 특징이 있었다.

[97]

[98] 3. 셀룰로오스 시트의 제조

[99] 3.1. 배지 내 당원의 종류 및 함량에 따른 셀룰로오스시트의 건조중량

[100] 세탁된 셀룰로오스 시트를 평평하게 펴서 18.15x18.15 cm로 자른 후, 무게를 측정하였다. 측정 후, 건조오븐에서 95°C, 1시간 건조하고 무게를 측정하여 건조 전후의 무게를 구하였다.

[101] 하기 표 1의 배지내 당원의 함량은 셀룰로오스 시트 전환 배양 시의 배양배지 내 당원의 함량을 의미한다.

[102] [표1]

균종	배지내 당원의 함량	셀룰로오스시트의 건조중량(18.15cm x 18.15cm당 g)
<i>K.rhaeticus</i> KOSS15	꿀 0.3%(과당 0.18%+포도당 0.12%)	0.22
	꿀 0.5%(과당 0.3%+포도당 0.2%)	0.35
	꿀 1.0%(과당 0.6%+포도당 0.4%)	0.55
<i>A.xylinum</i> IFO13693	포도당 2.0%	0.25
	포도당 3.0%	0.30
	포도당 5.0%	0.53

[103] 따라서, 동일한 중량의 시트를 제조하는 경우, 코마가테이박터 래티커스 KOSS15는 아세토박터 자일리넴 IFO13693과 비교하여 배지 내 당원의 함량을 약 6배 절감할 수 있음을 확인하였다. 또한, 꿀 대신 3:2의 비율로 포함된 과당 및 포도당을 당원으로 사용한 경우에도 동등한 효과가 나타남을 확인하였다.

[104]

[105] **3.2. 배지 내 당원 및 함량에 따른 셀룰로오스 시트의 구성**

[106] 셀룰로오스 시트의 구성당의 함량을 확인하였다.

[107] [표2]

균주 및 당원	당원	포도당(%)	셀로비오스(%)	기타(%)	시트형성상태
A.xylinum IFO13693	포도당 2.5%	18.9	54.7	26.4	양호
	과당2.5 %	16.4	58.9	24.7	양호
	설탕2.5 %	-	-	-	불량
	꿀2.5%	-	-	-	불량
K. rhaeticus KOSS15	포도당 2.5%	22.6	65.0	12.4	불량
	과당2.5 %	27.7	67.1	5.2	양호
	설탕2.5 %	-	-	-	불량
	꿀2.5%	32.3	59.4	8.3	양호

[108]

[109] **3.3. 배지 내 당원에 따른 셀룰로오스 시트의 물성**

[110] 시트를 정속 신장률법(20 mm/min)을 적용하는 실험기를 사용하여 시트의 인장강도를 측정하였다(KS M ISO 1924-2).

[111] 또한, 유체압력을 증가시켜 시트의 습윤 파열 강도를 측정하였다(KS M ISO 2758).

[112] [표3]

균주 및 당원	습윤 인장강도-세 로 (kN/m)	습윤 신장률-세로 (%)	습윤 파열강도(kPa)	시트형성상 태
<i>A.xylinum</i> IFO13693(포도당)	0.32	7.9	149	양호
<i>A.xylinum</i> IFO13693(과당)	0.49	12.5	104	양호
<i>A.xylinum</i> IFO13693(설탕)	-	-	-	불량
<i>A.xylinum</i> IFO13693(꿀)	-	-	-	불량
<i>K. rhaeticus</i> KOSS15(포도당)	1.30	9.0	193	불량
<i>K. rhaeticus</i> KOSS15(과당)	0.41	6.2	68	양호
<i>K. rhaeticus</i> KOSS15(설탕)	-	-	-	불량
<i>K. rhaeticus</i> KOSS15 (꿀)	1.03	9.1	264	양호

[113]

[114] **3.4. 배지 내 꿀 농도에 따른 구성당 및 셀룰로오스 시트의 물성 비교**

[115] 시트전환 배양 단계에서 사용되는 배지의 당원의 종류 및 함량을 각각 하기 표 4와 같이 꿀 0.3%, 꿀 0.5%, 꿀 1.0%로 한 것을 제외하고 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 셀룰로오스 시트를 제작하였다. 배양 전후의 꿀 농도에 따른 배지 내 당원의 종류 및 함량을 측정하였으며, 배지내 함유된 꿀의 농도별로 제작된 셀룰로오스 시트의 물성을 비교하였다(표 4).

[116] [표4]

꿀 농도	단계	과당(%)	포도당(%)	설탕(%)	건조중량(g)	시트물성
0.3%	배양전	0.14	0.00	0.03	-	촉감양호, 미끌미끌함
	배양후	0.11	0.00	0.06	0.22	
0.5%	배양전	0.23	0.07	0.05	-	촉감양호, 미끌미끌 함
	배양후	0.13	0.00	0.06	0.35	
1.0%	배양전	0.45	0.21	0.08	-	촉감양호, 두꺼운느 낌
	배양후	0.17	0.00	0.10	0.55	

[117] 표 4에 나타낸 바와 같이, 배지 내 함유된 꿀의 농도에 비례하여 구성당의 비율 및 시트의 건조중량이 증가됨을 확인하였다.

[118]

[119] **3.5. 배지 내 꿀의 종류에 따른 구성당 및 셀룰로오스 시트의 건조중량 비교**

[120] 꿀의 종류에 따른 셀룰로오스 시트의 생산 효율을 확인하기 위하여, 시트전환 배양 단계에서 사용되는 배지의 당원을 각각 하기 표 5와 같이 사양꿀 0.5%, 아카시아꿀 0.5%, 야생화꿀(잡꿀) 0.5%로 한 것을 제외하고 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 셀룰로오스 시트를 제작하였다. 배양 전후의 꿀의 종류에 따른 배지 내 당원의 종류 및 함량을 측정하였으며, 배지내 함유된 꿀의 종류별로 제작된 셀룰로오스 시트의 건조중량을 비교하였다.

[121] 결과는 표 5에 나타내었다.

[122] [표5]

꿀 종류	샘플상태	과당(%)	포도당(%)	설탕(%)	건조중량(g)
사양꿀	멸균전	0.27	0.18	0.00	0.31
	멸균후	0.22	0.13	0.00	
	배양후	0.08	0.00	0.18	
아카시아꿀	멸균전	0.27	0.14	0.00	0.42
	멸균후	0.24	0.13	0.00	
	배양후	0.10	0.00	0.17	
야생화꿀(잡꿀)	멸균전	0.28	0.14	0.00	0.44
	멸균후	0.24	0.13	0.00	
	배양후	0.08	0.00	0.16	

[123] 표 5에 나타낸 바와 같이, 셀룰로오스 제작에 이용되는 꿀의 종류에 따른 건조 중량(생산효율)은 모두 우수한 것으로 확인되었으나, 그 중에서도 아카시아꿀과 야생화꿀(잡꿀)이 더 우수하였으며, 야생화꿀(잡꿀)이 가장 우수함을 확인하였다(도 6 및 7).

[124]

[125] [수탁번호]

[126] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

[127] 수탁번호 : KCCM12270P

[128] 수탁일자 : 20180530

[129]

[130]



**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

To: SK bioLand
152, Manhae-ro,
Danwon, Ansan,
Gyeonggi 15407,
Republic of Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Komagataeibacter rhaziens</i> KOSS15	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM12270P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May, 30, 2018 (date of the original deposit). ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongje-nae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 03641 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) Date: May, 30, 2018

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form BP/4 (sole page)

한국미생물보존센터

03942 서울 서대문구 홍제2가길 45 유림빌딩 Tel: 02-397-0950 Fax: 02-397-0850

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

45 Hongje-nae-2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, 03641, Korea Tel: 02-397-0950 Fax: 02-397-0850

[131]

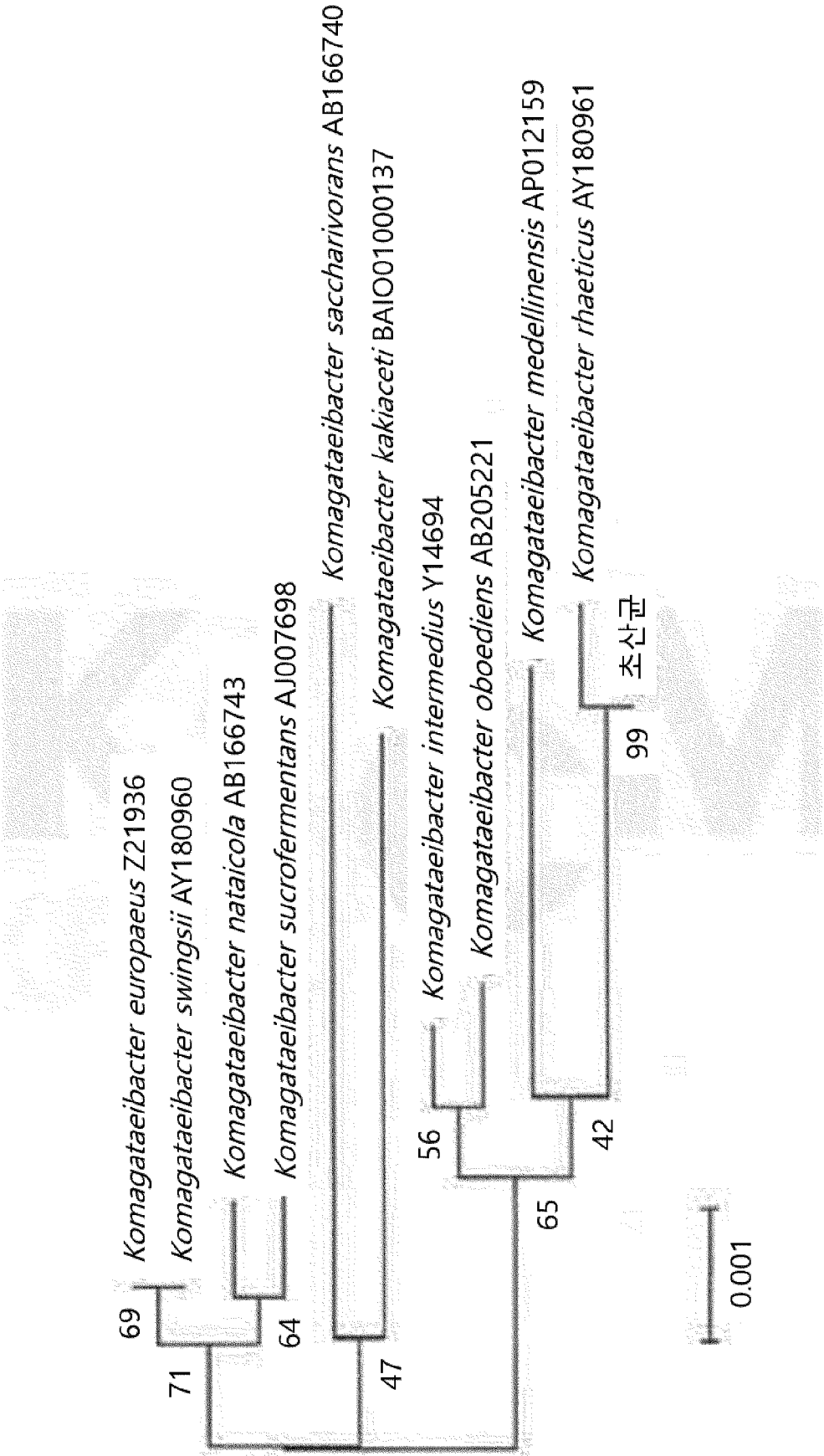
[132]

[133]

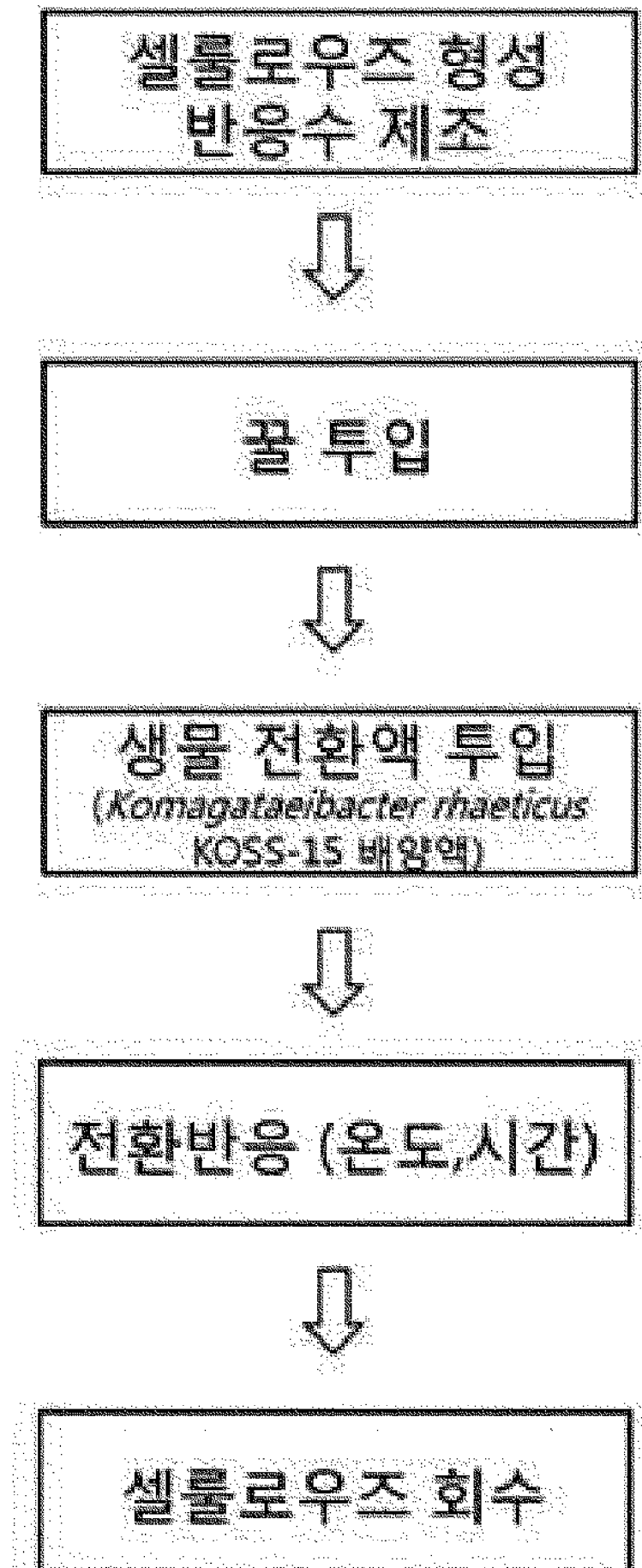
청구범위

- [청구항 1] (a) 꿀, 또는 (b) 포도당 및 과당의 당원; 및 프롤린을 포함하는 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 꿀은 사양꿀, 아카시아꿀, 또는 야생화꿀인, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 포도당 및 과당은 2:3의 중량 비율로 포함되는, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프롤린은 0.01 내지 1.0 중량%의 농도로 포함되는, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배지는 셀룰라아제를 추가적으로 포함하는, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 배지는 박테리아 셀룰로오스 생산 균주의 증균용인, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 7] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 MgSO_4 , CaCl_2 , 초산나트륨 및 초산, 또는 이들의 조합을 추가적으로 포함하는, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 배지는 박테리아 셀룰로오스 시트 생산용인, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 9] 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 박테리아 셀룰로오스 생산 균주는 코마가테이박터 래티커스(*Komagataeibacter rhaeticus*) 균주인, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 박테리아 셀룰로오스 생산 균주는 코마가테이박터 래티커스(*Komagataeibacter rhaeticus*) 균주인, 박테리아 셀룰로오스 생산 균주 배양용 배지 조성물.

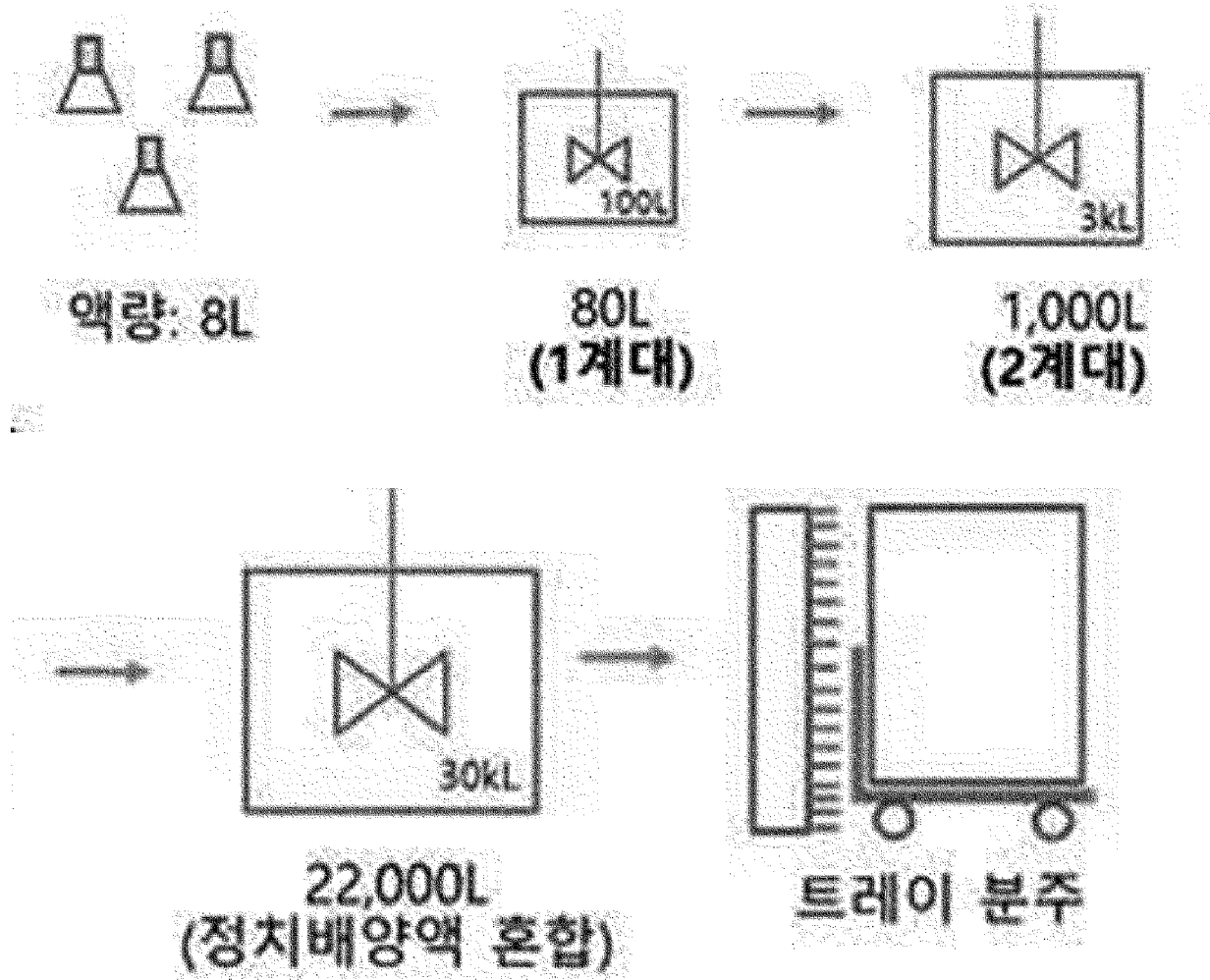
[도1]



[도2]



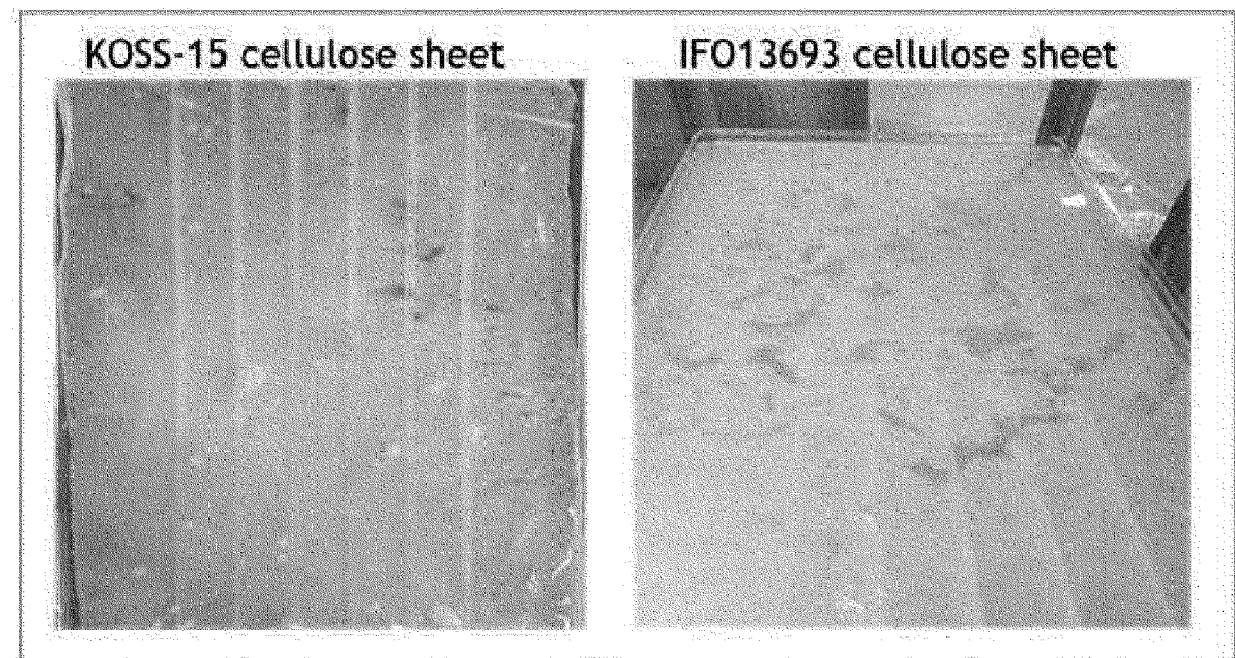
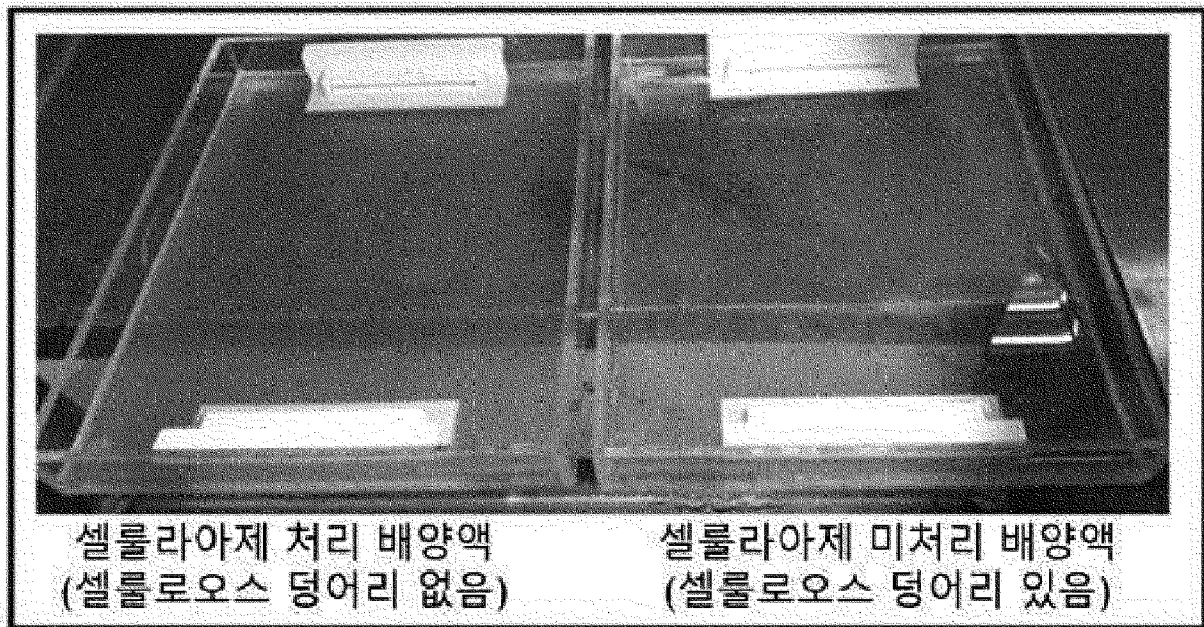
[도3]



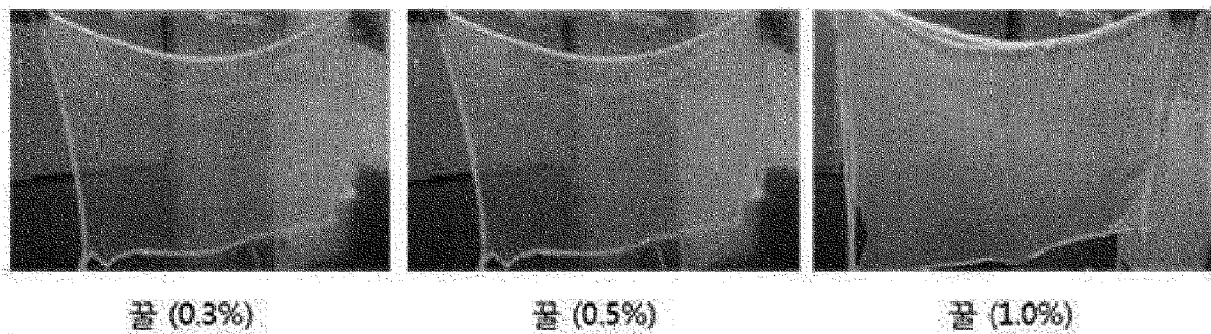
[도4]



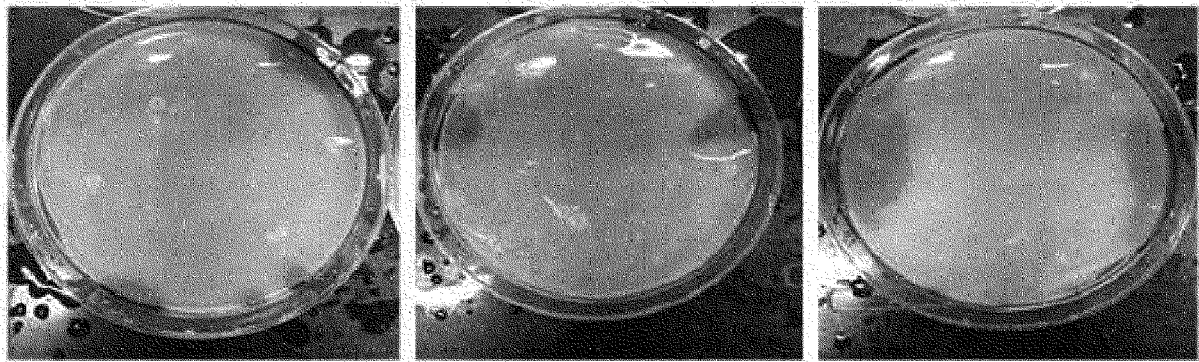
[도5]



[도6]



[도7]



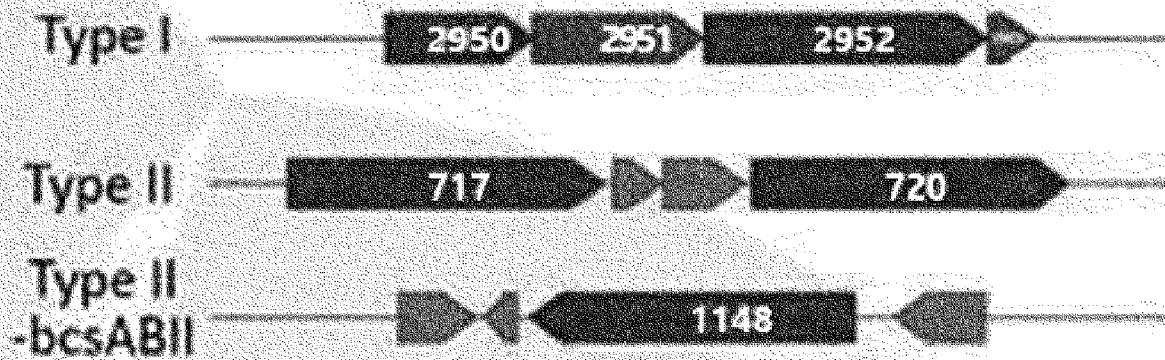
사양균

아카시아균

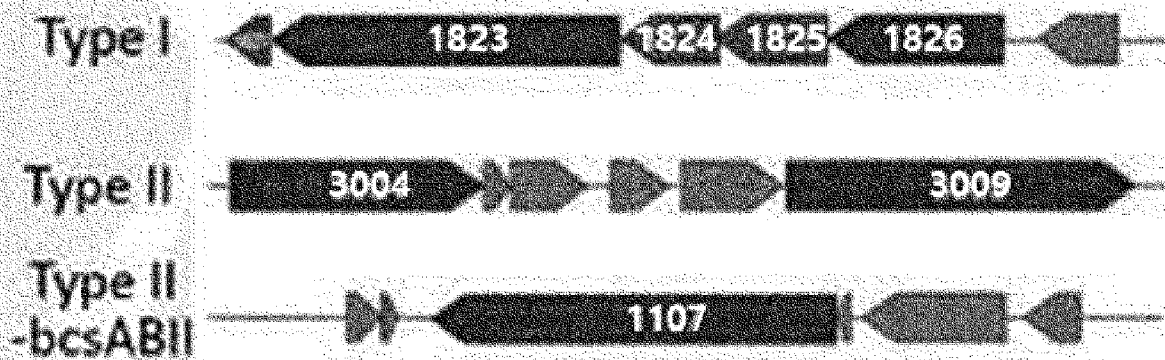
야생화균(잡화균)

[도8]

IFO13693



KOSS-15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/012010

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i, C12P 19/04(2006.01)i, C08J 5/18(2006.01)i, A45D 44/00(2006.01)i, A61K 8/02(2006.01)i, A61K 8/73(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; A23L 1/06; A45D 44/00; A61K 8/02; C12P 19/04; C12R 1/01; C08J 5/18; A61K 8/73

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cellulose, bacteria, Komagataeibacter, honey, glucose, fructose

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105647988 A (TIANJIN POLYTECHNIC UNIVERSITY) 08 June 2016 See abstract; claims 1-6.	1-3
A	MACHADO, R. T. A. et al. Komagataeibacter rhaeticus grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. Industrial Crops & Products. 19 June 2018 (Electronic publication), vol. 122, pages 637-646 See the entire document.	1-3
A	JP 2003-339392 A (KUMAMOTO TECHNOLOGY & INDUSTRY FOUNDATION) 02 December 2003 See the entire document.	1-3
A	KR 10-1793905 B1 (UROF, INC.) 01 December 2017 See the entire document.	1-3
A	COSTA, L. M. M. et al. Bacterial Cellulose Towards Functional Green Composites Materials. Journal of Bionanoscience. 2011, vol. 5, pages 167-172 See the entire document.	1-3
PX	KR 10-1970440 B1 (SK BIOLAND CO., LTD.) 18 April 2019 See claims 1-2, 4-8. * The above document is the registered document for the priority of the present PCT application.	1-3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 JANUARY 2020 (10.01.2020)

Date of mailing of the international search report

10 JANUARY 2020 (10.01.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/012010

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 6, 8
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 6 and 8 respectively refer to claims 5 and 7 which violate the manner of referring to dependent claims (PCT Rule 6.4(a)), and thus are unclear.

3. ☒ Claims Nos.: 4, 5, 7, 9, 10
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/012010

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 105647988 A	08/06/2016	None	
JP 2003-339392 A	02/12/2003	None	
KR 10-1793905 B1	01/12/2017	None	
KR 10-1970440 B1	18/04/2019	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/20(2006.01)i, C12P 19/04(2006.01)i, C08J 5/18(2006.01)i, A45D 44/00(2006.01)i, A61K 8/02(2006.01)i, A61K 8/73(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/20; A23L 1/06; A45D 44/00; A61K 8/02; C12P 19/04; C12R 1/01; C08J 5/18; A61K 8/73

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 셀룰로오스(cellulose), 박테리아(bacteria), 코마가테이박터(Komagataeibacter), 꿀(honey), 포도당(glucose), 과당(fructose)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CN 105647988 A (TIANJIN POLYTECHNIC UNIVERSITY) 2016.06.08 요약; 청구항 1-6	1-3
A	MACHADO, R. T. A. 등, "Komagataeibacter rhaeticus grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production", Industrial Crops & Products, 2018.06.19(전자공개), 122권, 페이지 637-646 전체 문헌	1-3
A	JP 2003-339392 A (KUMAMOTO TECHNOLOGY & INDUSTRY FOUNDATION) 2003.12.02 전체 문헌	1-3
A	KR 10-1793905 B1 (주식회사 유로프) 2017.12.01 전체 문헌	1-3
A	COSTA, L. M. M. 등, "Bacterial Cellulose Towards Functional Green Composites Materials", Journal of Bionanoscience, 2011, 5권, 페이지 167-172 전체 문헌	1-3
PX	KR 10-1970440 B1 (에스케이바이오랜드 주식회사) 2019.04.18 청구항 1-2, 4-8 * 본 PCT 출원의 우선권 출원의 등록 공보임	1-3

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 01월 10일 (10.01.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 01월 10일 (10.01.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

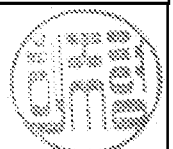
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 6,8
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 6, 8은 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a))을 위반한 청구항 5, 7을 인용하고 있어 불명료합니다.
3. ☒ 청구항: 4,5,7,9,10
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

CN 105647988 A

2016/06/08

없음

JP 2003-339392 A

2003/12/02

없음

KR 10-1793905 B1

2017/12/01

없음

KR 10-1970440 B1

2019/04/18

없음