(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0125868
(43) 공개일자 2020년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0049226
(22) 출원일자 2019년04월26일
심사청구일자 2019년04월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초동, 삼풍아파트)
진용수
3005 Sandhill Ln, Champaign, IL 61822, U.S.A.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

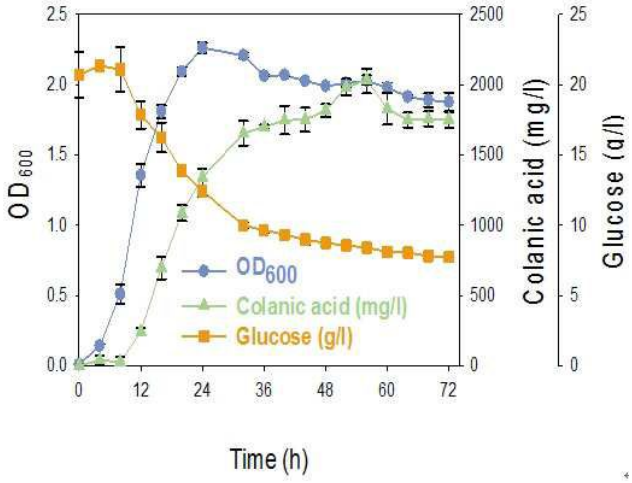
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **돌연변이 대장균을 이용한 콜라닉 산 생산**

(57) 요 약

본 발명은 콜라닉 산을 대량 생산하기 위한 균주 배양 배지 조성물 및 이를 이용하여 콜라닉 산을 대량 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 배양 배지의 성분 및 농도는 통계적인 방법을 이용하여 최적화된 것으로 이를 사용하여 콜라닉 산의 생산량을 크게 증가시킬 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12N 9/10 (2013.01)
(72) 발명자
윤은주
서울특별시 성북구 안암로 145(안암동5가)
김인정
서울특별시 성북구 안암로 145(안암동5가)
한형민
서울특별시 강서구 우현로 67, 118동 1404호(화곡동, 강서힐스테이트)
유소라
경기도 남양주시 다산중앙로82번길 15, 5108동 1404호(다산동, 다산 자연 앤 e편한세상)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018020753
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)중견연구자지원(3억초과~5억이하)
연구과제명	식의약 소재용 퓨코스의 생물공학적 생산 플랫폼 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하여 돌연변이 대장균 JM109 균주를 제조하는 단계; 및

상기 제조된 돌연변이 대장균 JM109 균주를 발효 배지에서 배양하는 단계;

를 포함하는, 콜라닉 산 생산방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 발효 배지는 글루코스(glucose), 트립톤(tryptone) 및 인산나트륨(Na_2HPO_4)을 포함하는 것인, 콜라닉 산 생산방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 발효 배지는 염화나트륨(NaCl), 황산마그네슘($MgSO_4$), 염화칼슘($CaCl_2$) 및 인산칼륨(KH_2PO_4)을 더 포함하는 것인, 콜라닉 산 생산방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 발효 배지는 글루코스 10 내지 30 g/l, 인산나트륨 7 내지 15g/l, 인산칼륨 1 내지 5 g/l, 염화나트륨 0.1 내지 1 g/l, 트립톤 1 내지 5 g/l, 황산마그네슘 0.1 내지 0.5 g/l 및 염화칼슘 0.005 내지 0.02 g/l 를 포함하는 것인, 콜라닉 산 생산방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 돌연변이 대장균을 이용한 콜라닉산 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 콜라닉 산은 음전하를 띄며 분자량이 3.4 kDa인 세포 외 다당류 중의 하나로, 장내세균과에 속하는 여러 세균들이 바이오필름(biofilm)을 형성하고 생장하면서 생산하는 것으로 알려져 있다. 콜라닉 산은 바이오필름의 3차원적 구조 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되며, 그 안에 있는 균들에게 파지 감염에 대한 저항성이나 삼투압, 탈수, 저온, 산화스트레스 같은 환경적 요인에 대한 저항성, 항생제에 대한 저항성 등을 부여한다. 콜라닉 산의 구조는 6개의 당이 반복하여 존재하는 구조를 이루고 있으며, 6개의 당은 각각 퓨코스 2개, 갈락토오스 2개, 글루코스 1개, 글루쿠론 산 1개이다. 추가적으로는 여기에 아세트산과 피루빈산을 잔기로 가진다. 이러한 단량체 당들 중 하나인 퓨코스는 희귀 당으로, 손쉽게 얻을 수 없지만 여러 생리활성 기능을 가지고 있어서 식의약 및 화장품 분야에 널리 쓰이고 있다. 식품소재로는 높은 수분 결합력으로 인해 응고제, 필름 형성제, 겔 형성제, 유화 안정제로 쓰이며 낮은 칼로리를 가지고 있어 다이어트 당으로도 사용되고 있다. 의약용으로는 항염증제, 항암제 및 면역 증진제 등으로 사용되고 있으며 미백효과, 보습효과, 피부 세포 재생 촉진, 노화방지

등의 효과로 인해 화장품류의 소재로도 사용되고 있다. 하지만 이러한 많은 용도에 비해 얻는 방법이 까다롭고 수율도 낮아 가격이 매우 높은 실정이다. 하지만 여기서 최대생산을 목표로 하는 콜라닉 산은 단량체로 퓨코스를 가지고 있고 그 양도 전체 질량의 약 1/3을 차지하고 있어 만약 콜라닉 산을 대량생산하게 된다면 이를 퓨코스 생산에 이용할 수 있을 것이다. 또한 최근 연구결과에 따르면 콜라닉 산 자체의 다양한 생리활성기능이 밝혀지고 있어 콜라닉 산의 이용가치가 증대되고 있는 실정이다.

[0003] 그러나 미생물을 이용한 콜라닉 산의 대량생산을 위한 배지 최적화에 대한 연구는 전무한 상태이다. 실제로 다른 종류의 세포 외 다당류 생산 연구들을 살펴보면 배지 성분의 변화에 따라 세포 외 다당류의 생산량이 크게 변한다는 사실을 참고한다면, 배지 최적화에 대한 연구가 필수불가결함을 알 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Front. Microbiol. 6:496(2015), Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 세포막을 이루는 지질다당류의 형성에 관여하는 유전자 중 *waaF* 유전자를 제거하면 불완전한 지질다당류를 형성하고, 그로 인해 해당 세포가 외부 스트레스를 받으면 이에 대한 방어기작으로 콜라닉산을 생산한다는 선행연구를 기초로 하여, 콜라닉 산의 생산에 최적인 균주를 개발하고, 배양 배지 최적화를 통해 콜라닉 산을 대량으로 생산하는 방법을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 *waaF* 유전자가 제거된 돌연변이 *E. coli* JM109 균주를 이용하고 배지의 최적화를 통한 콜라닉산 대량 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은,

[0008] 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하여 돌연변이 대장균 JM109 균주를 제조하는 단계; 및

[0009] 상기 제조된 돌연변이 대장균 JM109 균주를 발효 배지에서 배양하는 단계; 를 포함하는 콜라닉산 생산방법을 제공한다.

[0010] 공시균주에 해당하는 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하기 위하여 특정 유전자를 제거하기 위한 공지된 유전자 조작 기술이 제한없이 이용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 도 1에 도시된 람다-레드 재조합 기술을 이용하여 *waaF* 유전자가 제거된 돌연변이 대장균 JM109 균주를 제조하였다.

[0011] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 발효 배지 조성 및 농도의 최적화를 위하여 다양한 탄소원 및 질소원에 대한 균주의 콜라닉산 생산 수율을 확인하여 탄소원으로 글루코스를 사용하고 질소원으로 트립톤을 사용하는 경우 콜라닉산 생산률이 우수함을 확인하였다.

[0012] 이에 따라, 상기 발효 배지는 글루코스, 트립톤 및 인산나트륨(Na_2HPO_4)을 포함할 수 있고, 염화나트륨(NaCl), 황산마그네슘($MgSO_4$), 염화칼슘($CaCl_2$) 및 인산칼륨(KH_2PO_4)을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0013] 상기 발효 배지는 글루코스 10 내지 30 g/l, 인산나트륨 7 내지 15g/l, 인산칼륨 1 내지 5 g/l, 염화나트륨 0.1 내지 1 g/l, 트립톤 1 내지 5 g/l, 황산마그네슘 0.1 내지 0.5 g/l 및 염화칼슘 0.005 내지 0.02 g/l 를 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명자들은 균주 발효 배지의 최적화를 위해 부분 배치 설계 (fractional factorial design), 최급상승법 (steepest ascent method), 반응표면분석 (response surface methodology)과 같은 통계적 방법을 이용하여, 배지 혼합물에 들어가는 다양한 성분 중에서 콜라식 산 생산량에 가장 큰 영향을 끼치는 변수들을 선정하고 방대한 실험 조건의 수를 최소화하여 간편하고 효율적으로 배지의 최적조건을 선정하였다.

[0015] 이에 따라, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 최적화된 발효 배지는 글루코스 20 g/l, 인산나트륨 10.62 g/l, 인산칼륨 3.00 g/l, 염화나트륨 0.5 g/l, 트립톤 2.63 g/l, 황산마그네슘 0.24 g/l 및 염화칼슘 0.011 g/l 를 포함할 수 있다.

[0016] 상기 발효 배지에서 돌연변이 대장균 균주의 배양은 20 내지 30℃에서 수행될 수 있고, 구체적으로는 25℃에서 수행될 수 있다.

[0017] 돌연변이 대장균 균주를 발효 배지에서 배양하기 전에 LB 배지에서 전 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0018] 상기 LB 배지는 아가(agar)를 포함하며, 상기 전 배양 단계는 30 내지 40℃에서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 콜라닉 산 생산방법은 콜라닉 산 생산에 적합하도록 균주 및 배양 배지를 최적화한 것으로, 최적화 전보다 콜라닉 산의 생산이 현저히 증가하였다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 대장균 JM109 균주로부터 *waaF* 유전자를 제거하기 위한 감마-레드 매개 재조합 방법(λ-red mediated recombination method)을 간단히 도시한 것이다.

도 2는 *waaF* 유전자가 결실된 대장균 JM109 균주를 배양하는 배지에 존재하는 탄소원의 종류 및 농도에 따른 (A) 콜라닉 산 생산 및 (B) 세포 성장률의 차이를 비교한 것이다.

도 3은 *waaF* 유전자가 결실된 대장균 JM109 균주를 배양하는 배지에 존재하는 탄소원인 글루코스의 농도에 따른 (A) 콜라닉 산 생산 및 (B) 세포 성장률의 차이를 비교한 것이다.

도 4는 *waaF* 유전자가 결실된 대장균 JM109 균주를 배양하는 배지에 존재하는 질소원의 종류 및 농도에 따른 (A) 콜라닉 산 생산 및 (B) 세포 성장률의 차이를 비교한 것이다.

도 5는 중심합성계획법 기반 트립톤 및 제 2인산 나트륨 농도에 따른 콜라닉산 생산량의 3차원 반응표면도를 나타낸 것이다.

도 6은 최적 배지 조건(20.00 g/l 글루코스, 2.63 g/l 트립톤, 10.62 g/l Na_2HPO_4, 3.00 g/l KH_2PO_4, 0.50 g/l NaCl, 0.24 g/l $MgSO_4$, 및 0.011 g/l $CaCl_2$ *waaF* 유전자가 결실된 대장균 JM109 균주 배양한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0023] **[실시예 1] 유전자 제거**

[0024] 본 발명에 이용한 균주는 *E. coli* JM109 ΔwaaF로, 일반적인 *E. coli* JM109 균주에서 *waaF* 유전자가 제거되었다. 유전자 제거를 위하여 사용한 전략은 λ-red 재조합 기술로, 도 1에 간략하게 소개되어있으며, 상세 과정은 다음과 같다.

[0025] 1) pKD4 플라스미드를 이용하여 플립파아제 인식대상(FRT) 사이에 있는 카나마이신 저항 유전자, 및 *waaF*의 플랭킹 부위(flanking regions)와 상동성을 가지는 업스트림(upstream) 및 다운스트림(downstream) 유전자를 포함하는 서열단편을 PCR을 통해 증폭시킨다.

[0026] 상기 서열단편의 증폭에 사용된 프라이머 세트는 다음과 같다:

[0027] 정방향 프라이머: 5'-ATGGTGCCGTCC ATTATTATCGCGGATGCCGGAAGTTAACGAAGCTATTCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'(서열번호 1) 및 역방향 프라이머 5'- GATAACCCTCCGCAGCGTCACC TTTACGCACTTTGTGATAGCCGGTAATCATGGGAATTAGCCATGGTCC-3'(서열번호 2). 상기 프라이머의 밑줄친 서열 부위는 *waaF*의 상동 재조합 부위를 나타낸다.

[0028] 2) *E. coli* JM109에 pKD46 플라스미드를 삽입한다.

[0029] 3) pKD46 플라스미드가 삽입된 *E. coli* JM109에 1)과정에서 증폭된 선형 DNA 템플릿을 삽입시킨 후 pKD46 플라스미드를 발현시킨다.

[0030] 4) 플립파아제 재조합 단백질을 발현하는 pCP20 플라스미드를 삽입한 후 발현시켜 기존 *E. coli* JM109에서 *waaF* 유전자만 제거된 균주를 완성하였다.

[0032] **[실시예 2] 발효 조건**

[0033] 배지 최적화에 이용할 기본 배지로는 각 성분들의 영향을 쉽게 볼 수 있고, 분석에 최소한의 영향을 주는 배지인 M9 최소배지로 결정하였고, 상기 최소배지의 조성을 일부 변경하고 배지 성분의 농도범위를 다양하게 변경하여 사용하였다. 구체적으로 최적화 전 M9 최소 배지 조성은 10.00-30.00 g/l 글루코스(glucose), 1.00-2.00 g/l 트립톤(tryptone), 3.00-10.00 g/l 인산나트륨(Na_2HPO_4), 1.50-4.50 g/l 인산칼륨(KH_2PO_4), 0.12-0.36 g/l 황산마그네슘 ($MgSO_4$), 0.005-0.017 g/l 염화칼슘($CaCl_2$), 및 0.50 g/l 염화나트륨(NaCl)을 사용하였다. 조사결과 온도가 낮을 때 콜라닉 산이 많이 생산된다는 결과가 나왔으므로, 발효는 25° C로 진행하였다. 그 밖에 세부조건은 250 ml 삼각플라스크에 50 ml 로 진행하였고, 200 rpm으로 배양을 진행한 후 24시간 후의 균 생장정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하였다.

[0035] **[실시예 3] 콜라닉 산의 정량**

[0036] 콜라닉 산의 정량은 단량체 중 하나인 글루쿠론 산을 특정하게 정량하는 방식으로 진행하였다. 배양한 배지를 회수한 후 90-95° C 에 10분간 반응시켜 단백질을 불활성화시켰다. 그 후 4° C, 10,000 X g, 30분간의 원심분리하여 균은 침전물 형태로, 콜라닉 산은 상등액에 존재하도록 분리하였다. 상등액만을 회수한 후 상등액 부피의 3배에 해당하는 부피의 에탄올을 첨가하여 콜라닉산을 침전시켰다. 또 다시 4° C, 10,000 X g, 30분간의 원심분리를 통해 침전물을 회수한 후 증류수에 녹여서 글루쿠론 산 정량에 이용하였다. 글루쿠론 산 정량은 구체적으로 다음과 같이 수행하였다:

[0037] 1) 1 ml의 샘플에 12.5 mM 농도의 sodium tetraborate-sulfuric acid 용액 5 ml을 첨가한 후 100° C에 5분간 반응시킨다.

[0038] 2) 충분히 식힌 후 0.5% (w/v) 수산화나트륨 수용액에 hydroxydiphenyl을 1.5 g/l 로 녹인 용액을 100 μl 첨가한 후 충분히 섞어준다.

[0039] 3) 용액의 526 nm에서의 흡광도를 측정하여 표준 그래프에 대입하여 해당 샘플의 글루쿠론 산 농도를 계산한다.

[0040] 4) 표준 그래프는 글루쿠론 산 표준용액을 통해 도시한다.

[0042] **[실시예 4] 최적 탄소원 선정**

[0043] M9 최소배지 성분 중 다른 성분들은 그대로 둔 채 탄소원 종류와 농도만 변경하여 균 생장정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하였다. 탄소원은 글루코스, 수크로스, 글리세롤, 자일로오스, 당밀, 맥아 추출물 총 6가지를 이용하였다. 구체적으로 6.78 g/l Na2HPO4, 3.00 g/l KH2PO4, 0.50 g/l NaCl, 1.00 g/l NH4Cl, 0.24 g/l MgSO4, 및 0.011 g/l CaCl2을 포함하는 발효 배지에 5, 10, 15 및 20 g/l의 농도로 상기 탄소원을 추기하여 콜라닉 생산량을 측정하였다.

[0044] 도 2에 나타나 있듯이, 글루코스를 탄소원으로 했을 때 콜라닉 산이 가장 많이 생산되었으며 균 생장 결과도 나쁘지 않은 결과를 보였기에 최적 탄소원으로 글루코스를 선정하였다. 하지만 농도에 따른 차이는 확인하기 어려웠기에 농도별 보강실험을 진행하였다. 도 3을 보면 글루코스의 농도가 20 g/l일 때 콜라닉 산 생산량과 균 생장정도가 최대를 보였기에 후속 실험에서 탄소원을 글루코스 20 g/l로 진행하였다.

[0046] **[실시예 5] 최적 질소원 선정**

[0047] 탄소원은 앞선 실험에서 알아냈듯이 글루코스 20 g/l로 설정하고 다른 요인들은 그대로 둔 채 질소원의 종류와 농도를 변화시켜가며 균 생장정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하였다. 질소원은 유기실소로는 펩톤, 트립톤, 효모추출물, 요소, 옥수수 침지액, 무기질소로는 황산암모늄, 염화암모늄 모두 총 7가지를 이용하였다. 구체적으로 20.00 g/l glucose, 6.78 g/l Na_2HPO_4, 3.00 g/l KH_2PO_4, 0.50 g/l NaCl, 0.24 g/l $MgSO_4$, 및 0.011 g/l $CaCl_2$을 포함하는 발효 배지에 0.5, 1, 및 1.5 g/l의 농도로 상기 질소원을 추기하여 콜라닉 생산량을 측정하였다.

[0048] 도 4에 나타나 있듯이, 트립톤이 제공되었을 때 가장 높은 콜라닉 산 생산량을 보였다. 균 생장 측면에서도 효모추출물 다음으로 가장 좋은 결과를 보였다. 따라서 질소원으로는 트립톤을 선정하였으며 농도는 1.5 g/l로 후속 실험을 진행하였다.

[0049] 그 결과, 실시예 4 및 5를 통하여 탄소원 및 질소원을 각각 글루코스 및 트립톤으로 하여 최종 M9 최소배지 조성은 글루코스, 인산나트륨, 인산칼륨, 염화나트륨, 트립톤, 황산마그네슘 및 염화칼슘으로 결정하였다.

[0051] **[실시예 6] 콜라닉 산 합성의 배양 배지 최적화를 위한 통계적 방법.**

[0052] **<6-1> 부분요인배치법(Fractional factorial design, FFD)**

[0053] 해당 실험은 본격적으로 배지 성분들의 농도를 최적화 하기 위한 첫 번째 단계로, 부분요인배치법은 각 성분이 콜라닉 산 생산량에 얼마나 큰 영향을 미치는지 알아보기 위한 실험이다.

[0054] 콜라닉산 생산에 영향을 미치는 배양 배지에서 가장 중요한 성분을 스크리닝하기 위해, Minitab 18.1 (Minitab, State College, PA, USA)을 사용하여 FFD를 만들었다. FFD는 3 개의 레벨 (-1, 0 및 1) (표 1)을 갖는 6 개의 독립 변수로 구성되어 18 개의 실험 혼합물을 만들었다 (표 2). FFD에서는 포도당 (X1), 트립톤 (X2), Na_2HPO_4 (X3), KH_2PO_4 (X4), $MgSO_4$ (X5) 및 $CaCl_2$ (X6)의 양 (g/l)을 독립 변수로 취하였으며, 대장균 JM109 Δ*waaF* (Y1) 및 세포 밀도 (OD600; Y2)에 의해 생성된 콜라닉 산의 양 (mg/l)을 종속 변수로 하였다. 종속 변수의 코딩된 값은 다음 공식에 따라 얻어졌다:

[0055] $$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

[0056] 여기서, x_i는 배지 성분의 레벨 (코딩된 값)이고, X_i는 레벨 x_i에서의 배지 성분의 실제 값이고, X_0는 기준점에서의 배지 성분의 실제 값이고, ΔX_i는 단계 변화 값이다. 모든 실험은 3 번 수행되었다.

[0057] FFD의 실험 결과를 토대로 콜라닉 산 생산에 중요한 영향을 미치는 구성 요소를 식별하기 위해 회귀 분석을 수행하였다. 간단히 말해, X_i가 계수 계산치(Coefficient estimate)의 절대 값이 높으면 X_i가 콜라닉 산 생성에 중요한 영향을 미친다는 것을 의미한다. X_i가 계수 계산치(Coefficient estimate)가 음수이면 X_i가 콜라닉 산 생산에 부정적인 영향을 미친다는 것을 의미하고 양수이면 긍정적인 영향을 끼친다.

[0058] 실험 농도의 설정은 M9 최소배지와 앞선 실험들은 기준으로 설정하였으며, 표 1에 정리하였다. 설정된 농도로 부분요인배치를 설계하였고, 설계에 따라 실험을 한 후 균 생장정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하여 표 2에 정리하였다. 정확한 결과를 도출하기 위해 회귀분석을 실행하였고, 회귀분석 결과는 표 3에 나와있다. 회귀분석 결과 X2와 X3, 즉 트립톤과 제 2인산 나트륨이 콜라닉 산 생산량에 큰 영향을 끼친다는 것을 확인하였으며, 설정된 농도범위에서는 농도가 높을수록 콜라닉 산 생산량이 증가한다는 것을 알아내었다. 따라서 다음 실험으로는 이 두 성분의 농도를 최적화하는 실험을 진행하였다.

표 1

[0060] **부분요인배치법 농도범위 설정**

Independent variable (g/l)		Name of variable		Level[a]		
				-1	0	+1

X_1		Glucose		10	20	30
X_2		Tryptone		1.0	1.5	2.0
X_3		Na_2HPO_4		3.78	6.78	9.78
X_4		KH_2PO_4		1.5	3.0	4.5
X_5		$MgSO_4$		0.12	0.24	0.36
X_6		$CaCl_2$		0.005	0.011	0.017

[0061] [a] $x_1 = (X_1 - 20)/10$; $x_2 = (X_2 - 1.5)/0.5$; $x_3 = (X_3 - 6.78)/3$; $x_4 = (X_4 - 3)/1.5$;

[0062] $x_5 = (X_5 - 0.24)/0/12$; $x_6 = (X_6 - 0.011)/0.006$

표 2

[0064] **부분요인배치법 실험설계, 결과**

Run	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6		Y_1 (CA; mg/l)a	Y_2 (OD_{600})a
1	-1	1	1	-1	-1	-1		1289.8 ± 20.1	2.02 ± 0.05
2	1	1	-1	-1	-1	1		822.1 ± 71.6	1.58 ± 0.05
3	-1	1	-1	-1	1	1		752.4 ± 30.4	1.79 ± 0.04
4	1	1	-1	1	-1	-1		817.3 ± 17.9	1.66 ± 0.08
5	0	0	0	0	0	0		1201.7 ± 72.8	1.71 ± 0.06
6	-1	-1	1	-1	1	1		1075.3 ± 33.9	1.18 ± 0.03
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1		671.5 ± 51.6	1.22 ± 0.01
8	1	-1	-1	-1	1	-1		690.6 ± 20.7	1.07 ± 0.09
9	-1	1	1	1	-1	1		1287.0 ± 13.1	2.43 ± 0.03
10	-1	-1	-1	1	-1	1		224.0 ± 11.7	1.48 ± 0.02
11	1	1	1	1	1	1		1447.3 ± 88.8	2.33 ± 0.09
12	1	-1	1	-1	-1	1		1075.3 ± 24.4	1.24 ± 0.07
13	1	-1	1	1	-1	-1		849.1 ± 15.8	1.27 ± 0.01
14	1	1	1	-1	1	-1		1210.6 ± 45.7	2.09 ± 0.08
15	1	-1	-1	1	1	1		676.3 ± 32.3	1.31 ± 0.05
16	0	0	0	0	0	0		1356.3 ± 49.8	1.66 ± 0.01
17	-1	-1	1	1	1	-1		770.8 ± 18.8	1.41 ± 0.08
18	-1	1	-1	1	1	-1		954.8 ± 73.6	1.76 ± 0.08

[0065] [a] Data were expressed as means ± standard deviations of triplicate experiments

표 3

[0067] **부분요인배치법 결과 회귀분석**

Source	Coefficient estimate	Mean square	*F*-value	P-valuea
Model		117087	13.09	0.028
Intercept	913.4			0.000
X_1	35.2	19814	2.22	0.233
X_2	159.3	405992	45.40	0.007
X_3	212.3	720865	80.62	0.003
X_4	-35.1	19679	2.20	0.235

X_5	33.9	18363	2.05	0.247
$X_1 \times X_2$	-33.5	17977	2.01	0.251
$X_1 \times X_4$	34.0	18493	2.07	0.246
$X_1 \times X_6$	50.1	40168	4.49	0.124
$X_2 \times X_4$	89.0	126744	14.17	0.033
Curvature		237603	26.57	0.014
Residual		8942		
Lack of fit		7435	0.62	0.668
Pure error		11956		

[0068] [a]The results with P-values higher than 0.3 are not shown.*R^2=0.9839

[0070] **[실시예 7] 최급상승법**

[0071] 부분요인배치법에서 선별된 두 성분의 최적농도를 알기 위해 우선 대략의 최적농도를 알아낼 수 있는 최급상승법을 진행하였다. 설정된 농도범위에서는 두 성분 모두 농도가 높아질수록 콜라닉 산의 생산량이 증가하므로 두 성분의 농도를 같이 높여가며 균 생장정도와 콜라닉 산 생산량을 측정하여 두 성분의 대략적인 최적농도범위를 알아내었다. 표 4를 보면 예상대로 두 성분의 농도가 높아질수록 콜라닉 산의 생산량이 증가하다가 8번 실험에서 최댓값을 나타내었다. 따라서 트립톤은 2.90 g/l, 제 2인산 나트륨은 10.98 g/l 부근에서 최적조건이 있음을 확인하였다.

표 4

[0073] **최급상승법 실험설계, 결과**

Run	X_2	X_3	CA (mg/l)	OD_{600}
1	1.50	6.78	1224.9 ± 11.4	1.52 ± 0.06
2	1.70	7.38	1326.7 ± 78.3	1.70 ± 0.01
3	1.90	7.98	1391.3 ± 179.4	1.85 ± 0.04
4	2.10	8.58	1593.3 ± 107.0	2.08 ± 0.08
5	2.30	9.18	1581.3 ± 69.9	2.23 ± 0.08
6	2.50	9.78	1691.0 ± 82.2	2.34 ± 0.07
7	2.70	10.38	1830.0 ± 65.6	2.49 ± 0.06
8	2.90	10.98	1887.4 ± 110.4	2.67 ± 0.10
9	3.10	11.58	1701.4 ± 53.7	2.78 ± 0.04

[0075] **[실시예 8] 중심합성계획법(central composite design, CCD)을 통한 표면반응법**

[0076] 최급상승법에서 나온 결과를 바탕으로 트립톤 및 Na_2HPO_4의 농도 대략의 최적조건을 전후로 하여 중심합성계획법을 실시하였다.

[0077] 구체적으로, 최대 콜라닉 산 생성을 위한 2 가지 배양 배지 성분 (즉, 트립톤 및 Na_2HPO_4)의 최적 농도를 결정하기 위해, CCD는 5 개의 코드 값(-1.414, -1, 0, 1 및 1.414)으로 수행되었다. 두 가지 인자 (트립톤 및 Na_2HPO_4)의 코드 값은 다음 공식을 사용하여 계산되었다:

[0078] $$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (1)$$

[0079] 회귀 분석에 기초하여 트립톤 및 Na_2HPO_4의 최적 농도를 시뮬레이션하기 위해 3차 모델을 선택하였다. 3차 모델의 공식은 다음과 같다:

[0080] $$y = b_0 + \sum b_1 x_i + \sum b_2 x_j + \sum b_3 x_i x_j + \sum b_4 x_i^2 + \sum b_5 x_j^2 + \sum b_6 x_i^2 x_j + \sum b_7 x_i x_i^2 \quad (2),$$

[0081] 여기서 xi 및 xj는 독립 변수의 코드 값이고 y는 예측된 응답(콜라닉 산 생성량)이다. 반응 (y)에 영향을 나타내는 다양한 회귀 계수 b_0, b_1, b_2, b_3, b_4, b_5 및 b_6은 절편 (b_0), 선형 (b_1, b_2), 2 요소 상호 작용 (b_3), 2 차 (b_4, b_5) 및 3차 (b_6, b_7)를 나타낸다. 콜라닉 산 생산에 대한 3차 모델의 각 계수는 회귀 분석을 수행하여 얻었다. 고정된 모델을 바탕으로 Design-Expert 7.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 콜라닉 산 생산을 위한 트립톤 및 Na_2HPO_4의 최적 농도를 찾기 위해 반응 표면 플롯을 만들었다.

[0082] 결과는 표 5와 같이 나왔으며, 회귀분석 결과는 표 6에 나타내었다. 이를 바탕으로 트립톤과 Na_2HPO_4의 농도에 따른 콜라닉 산 생산량을 3차원 표면도로 표현하였다(도 5). 그 후 콜라닉 산의 최대생산량을 이끌어내는 점을 찾아서 확인실험을 진행하였다.

표 5

[0084] **중심합성계획법 실험설계, 결과**

Run	Factor[a]			CA (mg/l)b	OD_{600}[b]
	X_2	X_3			
1	-1	-1		1771.3 ±37.2	2.53 ±0.01
2	-1	1		1503.6 ±48.9	2.57 ±0.03
3	0	-1.414		1649.7 ±47.1	2.75 ±0.01
4	0	0		1837.3 ±65.0	2.63 ±0.08
5	0	0		1704.2 ±79.0	2.76 ±0.02
6	0	0		1751.4 ±96.0	2.72 ±0.06
7	-1.414	0		1873.4 ±112.0	2.56 ±0.11
8	1	-1		1651.3 ±221.6	2.33 ±0.08
9	1.414	0		1639.5 ±61.7	2.69 ±0.09
10	0	0		1808.7 ±110.8	2.71 ±0.02
11	0	0		1840.2 ±171.0	2.68 ±0.13
12	1	1		1774.5 ±101.0	2.62 ±0.10
13	0	1.414		1788.6 ±188.9	2.72 ±0.01

[a] $X_2 = (X_2 - 2.9)/0.2$; $X_3 = (X_3 - 10.98)/0.6$.

[b] Data were expressed as means ± standard deviations of triplicate experiments.

표 6

[0086] **중심합성계획법 결과 회귀분석**

Source	Coefficient estimate	Mean square	*F*-value	*P*-value
Model		15961.07	4.71	0.054
Intercept	1795.22			
X_2	-82.68	27345.92	8.06	0.036
X_3	49.10	9644.83	2.84	0.153
$X_2 \times X_3$	97.72	38198.51	11.26	0.020
X_2^2	-35.06	8551.89	2.52	0.173

X_3^2	-53.68	20042.24	5.91	0.059
$X_2^2 \times X_3$	-85.26	14537.75	4.29	0.093
$X^2 \times X_3^2$	120.42	29000.23	8.55	0.033
Residual		3391.46		
Lack of fit		7848.15	3.45	0.137
Pure error		2277.28		

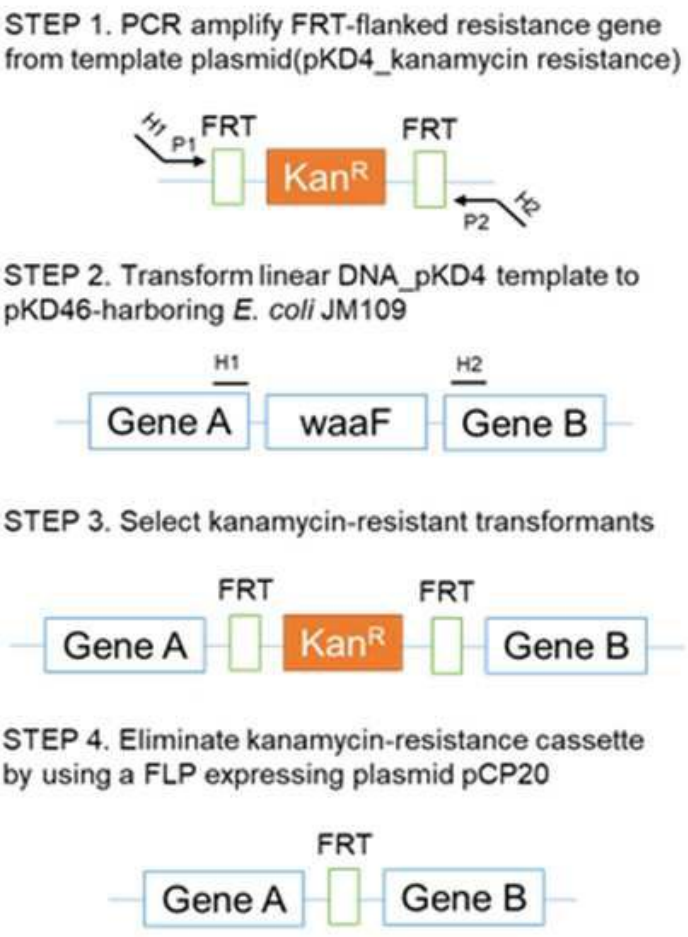
[0087] $*R^2$=0.8682

[0089] **[실시예 8] 최적배지 확인**

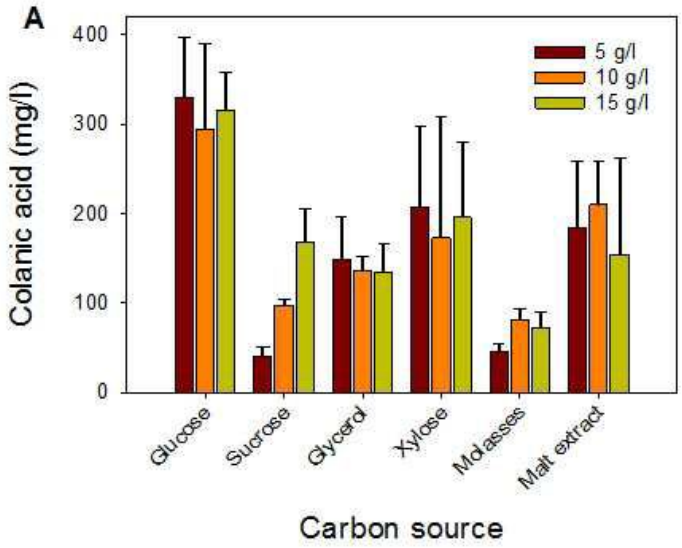
[0090] 최적조건으로 나온 20.00 g/l 글루코스, 2.63 g/l 트립톤, 10.62 g/l Na_2HPO_4, 3.00 g/l KH_2PO_4, 0.50 g/l NaCl, 0.24 g/l $MgSO_4$, 및 0.011 g/l $CaCl_2$을 포함하는 발효 배지에서 25° C에서 200 rpm으로 배양한 결과 최대 콜라닉 생산량이 2052.8 mg/l로 확인되었다(도 6). 이는 M9 배지를 최적화하기 전보다 그 생산량이 10배 가량 증가한 수치임을 확인하였다.

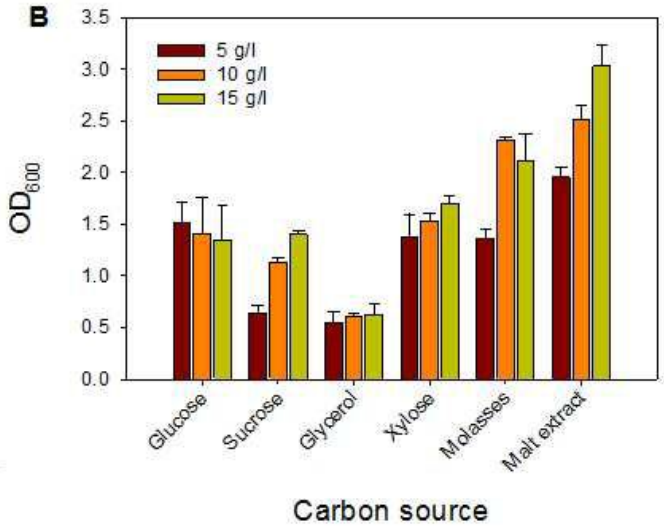
도면

도면1

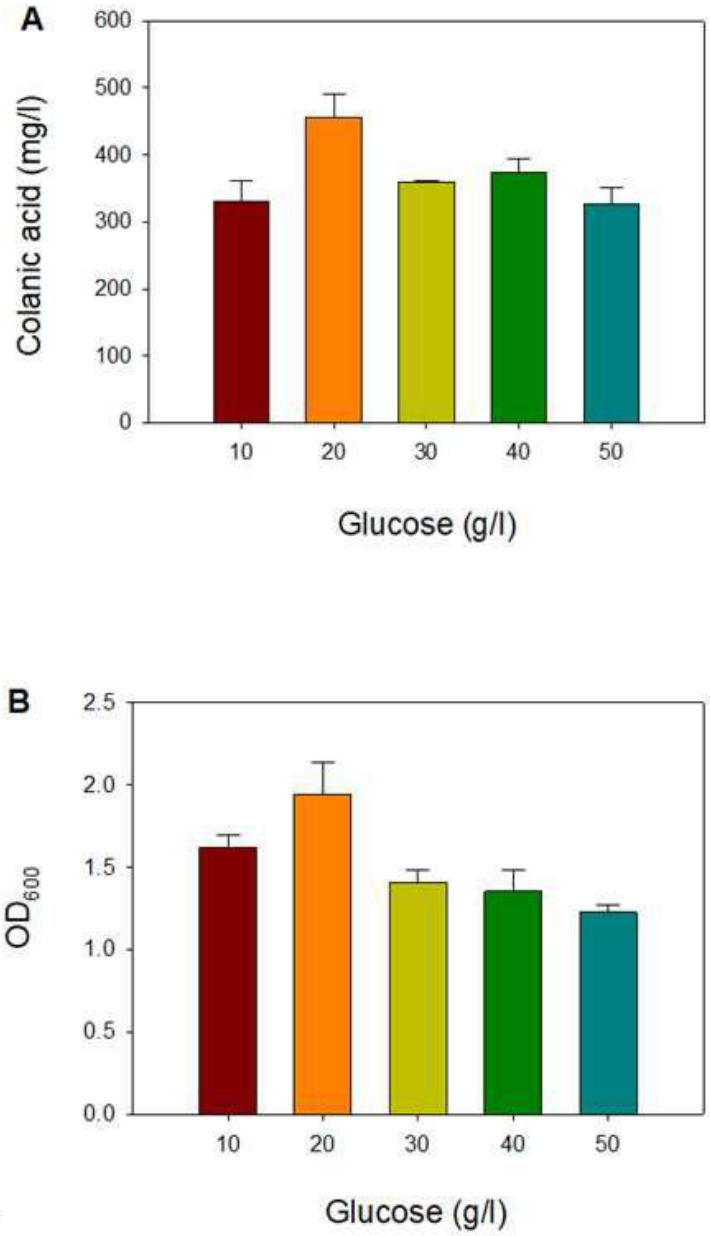


도면2

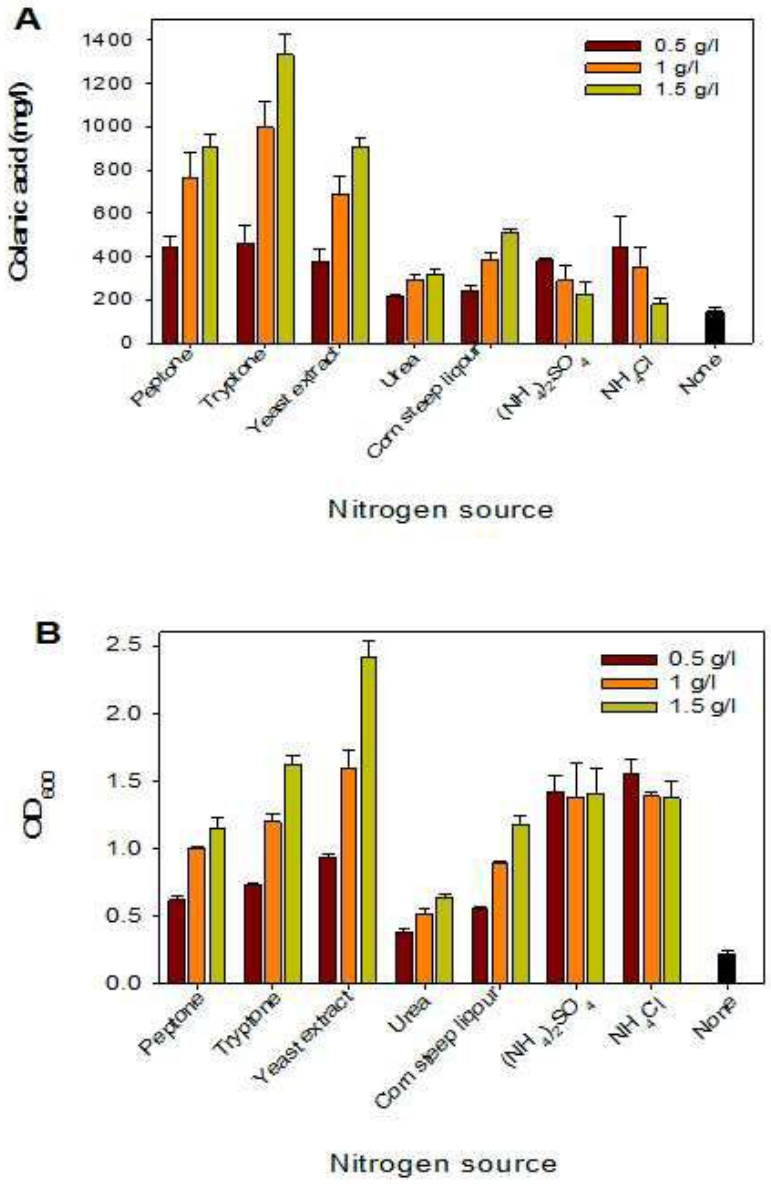

A
Colanic acid (mg/l)
400
300
200
100
0
5 g/l
10 g/l
15 g/l
Glucose
Sucrose
Glycerd
Xylose
Molasses
Malt extract
Carbon source


B
OD600
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
5 g/l
10 g/l
15 g/l
Glucose
Sucrose
Glycerol
Xylose
Molasses
Malt extract
Carbon source

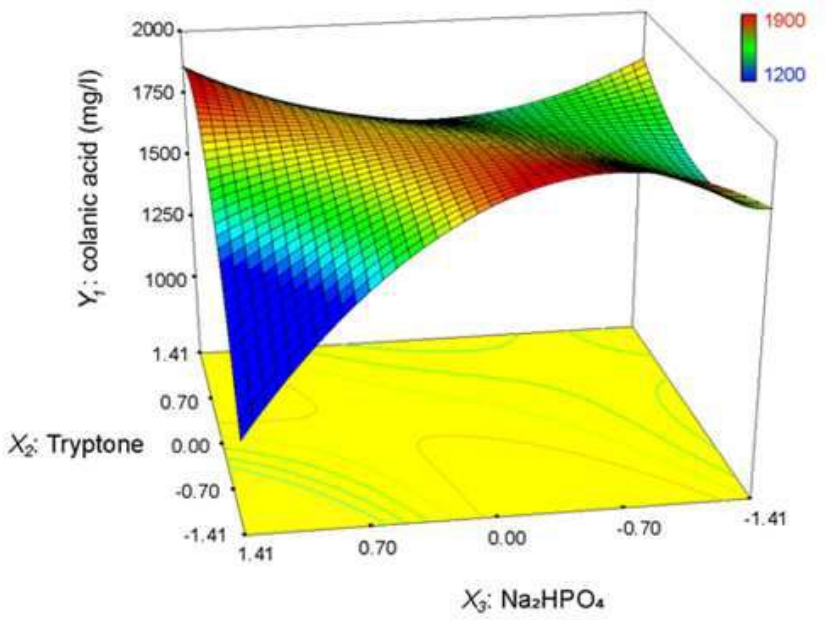
도면3


A
Colanic acid (mg/l)
600
500
400
300
200
100
0
10
20
30
40
50
Glucose (g/l)
B
OD600
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10
20
30
40
50
Glucose (g/l)

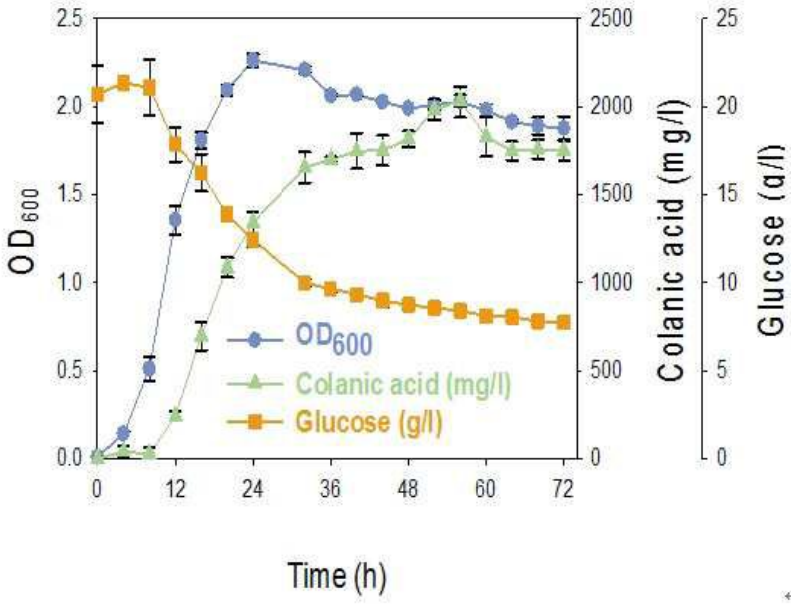
도면4


A
Colanic acid (mg/l)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0.5 g/l
1 g/l
1.5 g/l
Peptone
Tryptone
Yeast extract
Urea
Corn steep liquor
(NH4)2SO4
NH4Cl
None
Nitrogen source
B
OD600
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.5 g/l
1 g/l
1.5 g/l
Peptone
Tryptone
Yeast extract
Urea
Corn steep liquor
(NH4)2SO4
NH4Cl
None
Nitrogen source

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Production of colanic acid by a mutant Escherichia coli

<130> P19U13C0121

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

atggtgccgt ccattattat cgcggatgcc ggaagttaac gaagctattc ttgtgtaggc 60

tggagctgct tc 72

<210> 2

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 2

gataaccctc cgcagcgtca cctttacgca ctttgtgata gccggtaatc atgggaatta 60

gccatggtcc 70