



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0048778  
(43) 공개일자 2010년05월11일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) C12P 19/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0108084

(22) 출원일자 2008년10월31일

심사청구일자 2008년10월31일

(71) 출원인

일동제약주식회사

서울특별시 서초구 양재동 60

(72) 발명자

강대중

경기 용인시 기흥구 보라동 현대모닝사이드1차아파트 309-404

송정민

서울 성동구 응봉동 동아리버그린아파트 305-603

(뒷면에 계속)

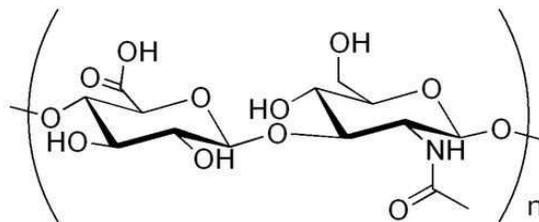
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 미생물 배양에 의한 히알우론산을 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 히알우론산을 생산하는 능력이 뛰어난 스트렙토코커스 속 ID9102를 이용하여 고분자의 히알우론산을 생산하는 제법에 관한 것이다. 이를 상세히 설명하면 용혈성이 없고 히알우로니다제를 생산하지 않는 스트렙토코커스 속 ID9102에서 히알우론산을 고수율로 생산하며 평균분자량 약 590만 달톤의 고분자 히알우론산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**임중혁**

서울특별시 구로구 가리봉동

**강재훈**

서울 강남구 대치동 국제아파트 3-1006

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

히알루론산을 생산하는 스트렙토코커스 속 ID9102 (기탁번호 KCTC11395BP)

**청구항 2**

제1항의 균주를 이용하여 히알루론산을 생산함에 있어서, 배지 조성에 글루타민 0.6g/l, 글루타민 0.6g/l 와 수산 0.2g/l 또는 글루타민 0.6g/l 와 수산 0.2g/l 와 글루콘산나트륨 1g/l 중에서 선택되는 어느 한 그룹의 조성을 추가로 첨가하여 히알루론산을 생산하는 것을 특징으로 하는 방법

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 히알루론산을 생산하는 능력을 가진 스트렙토코커스 속 ID9102를 이용한 히알루론산을 생산하는 방법에 관한 것으로서 생산 배지 조성의 최적화를 통한 고수율과 효율적인 배양 조건을 통해서 고분자의 히알루론산을 생산하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 히알루론산은 connective, epithelial, neural tissues에 폭넓게 분포되어 있는 non-sulfated glycosaminoglycan이다. 작용 면에서는 extracellular matrix의 주요한 성분으로 cell proliferation, cell migration 등에 큰 영향을 미치며 부족하게 되면 신체의 골격 유지의 많은 불편함을 느끼게 된다. 평균 70kg의 남성은 몸에 약 15g의 히알루론산을 보유하고 있으며 그 중 1/3은 매일 분해되거나 합성되는 매우 빠른 대사 과정을 겪는 특징을 가지고 있다.

[0003] 히알루론산(Hyaluronic acid(HA), Hyaluronan, (C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>NNaO<sub>11</sub>)<sub>n</sub> (n>1000))은 생체에 존재하는 고분자로서 glycosaminoglycan이라는 다당류이다. 구조적인 내용을 살펴 보면 [도 1]과 같이 D-glucuronic acid와 N-acetylglucosamine이 β-1,3 과 β-1,4 결합으로 반복적으로 연결된 구조를 띠고 있다. 수용성 물질이며 점도가 매우 높고 고탄성의 특성을 가지고 있으며 분자량은 1,000~10,000,000 daltons에 이르는 광범위한 직쇄의 다당류이다.

[0004] 히알루론산은 1934년 Meyer와 Palmer에 의해서 소년의 초자액으로부터 처음으로 발견되었고 피부, 눈의 초자체, 관절액, 근육, 태줄, 닭벼슬 등에 많이 분포되어 있기 때문에 이들의 기관에서 분리 추출 등을 통해서 얻어지기도 한다. 특히 태반이나 관절 내에 많이 분포하고 있는 것으로 알려져 있으며 대부분의 생산은 닭벼슬에서 추출한다.

[0005] 히알루론산은 염 구조로써 우수한 효능 효과를 보여 주고 있으며 보습효과가 강하여 물리적 마찰 상태에서 강력한 윤활 작용으로써 기능이 매우 우수하며 세균 등의 침입에 대한 보호 효과 등의 효능과 물성에 있어서 매우 바람직한 장점을 보유하고 있기 때문에 필요한 적용증이 많을 수 밖에 없다는 것은 짐작할 수 있다. 이 같은 장점은 화장품이나 의약품으로써의 역할뿐만 아니라 의약품외품과 소재 그리고 식품에까지 적용할 수 있으며 지금도 히알루론산을 기반으로 하는 많은 분야의 개발을 위한 시도는 계속 되고 있는 상황이다.

[0006] 1970년 후반까지 히알루론산은 소위 "goo" molecule로서 extracellular matrix의 평범한 구성성분으로 묘사되어 왔다. 이 후로 synovial fluid의 주요한 구성물질로 점도를 증가시키고 윤활작용을 하는 중요한 역할에 대해 많은 것이 밝혀졌으며 articular cartilage의 chondrocyte를 감싼 채 존재하고 link protein의 존재 하에 aggrecan monomers가 히알루론산과 결합하고 highly negative charge의 aggregates가 된다. 이들은 물을 흡수하고 cartilage에 탄성을 주게 된다. Cartilage의 히알루론산은 나이가 들면서 분자량은 감소하고 양은 증가하는 패턴을 보이게 된다. 연골 조직 외에 히알루론산은 피부에서도 주요한 성분이다. Tissue repair에 관련되어

있으며 피부가 자외선에 과다 노출되면 피부는 히알우론산의 생산을 멈추고 분해속도를 증가시키게 됨으로써 피부의 탄성이 약화되는 계기가 되는 것이다. 특히 2003년 FDA는 Restylane이라는 히알우론산 제품을 soft tissue의 defects를 채우는 용도를 승인함으로써 성형 외과에서의 히알우론산의 사용량은 계속 증가하고 있으며 이 후에는 가장 유망한 분야로 각광을 받고 있다.

[0007] 히알우론산을 생산하는 방법은 히알우론산 보유 생체조직에서 추출하는 방법과 미생물에서 발효 생산하는 두 가지 방법이 있으며 이에 대한 특징을 간단하게 기술하면 다음과 같다.

[0008] 첫째, 닭벼슬이나 탯줄 등의 조직에서 추출하는 방법은 바이러스의 감염이나 조직의 유지 관리 및 회수 등의 번거로움과 오염 등의 단점을 극복하기가 어려울 것이며 특히 생산 수율이 낮고 고분자의 히알우론산의 획득이 어렵고 chondroitin sulfate와 glycosaminoglycan sulfate 등의 불순물 처리해야 하는 문제 결국 생산 비용과 정제 과정이 수월하지 않아서 경쟁력을 확보하기가 어려울 것으로 보인다. 하지만 추출과 분리정제의 과정 만으로 손쉽게 획득할 수 있는 장점을 가지고 있다.

[0009] 둘째, 미생물 발효를 통한 생산 방법은 미생물을 조작하고 분리정제함에 있어서 endotoxin의 제거가 까다롭다는 단점이 있으나 스트렙토코쿠스 속 중 파이오제네스, 페칼리스, 주에피데미쿠스 등의 히알우론산 생산 균주를 이용한 생산 방법은 생산 비용이 저렴하고 고분자의 히알우론산 생산으로 개발 가능하고 고수율로 개발할 수 있어 경쟁력이 높다고 할 수 있다.

[0010] 특히 고분자의 히알우론산은 저분자의 히알우론산에 비해서 점도와 탄성력이 우수하며 골관절 치료제나 안과 치료용 등의 고부가가치 약물로 각광받고 있기 때문에 고분자의 히알우론산의 개발이 필요한 실정이다. 그러나 조직에서 추출하는 방법으로는 원하는 고분자의 히알우론산을 생산할 수 없다. 그러므로 이를 해결하기 위해서는 고분자를 안정적으로 생산할 수 있는 생산 균주의 확보와 독창적인 배양 배지 조성과 효율적인 배양 조건을 발명함으로써 경쟁력 있는 히알우론산 생산 방법을 개발하는 것이 가장 바람직할 것이다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

[0011] 스트렙토코쿠스 속 고유의 용혈성이 없고 히알우로니다제 효소 특성을 가지고 있지 않는 균주를 이용해서 고분자의 히알우론산을 개발하는 것이다.

[0012] 기존의 미생물 배양 방법으로는 대부분 평균분자량 500만 달톤 이하이며 이보다 높은 고분자의 히알우론산의 생산을 위해서는 새로운 생산 균주의 확보와 독창적인 미생물 배양 배지 조성의 확보가 필수적이다.

**과제 해결수단**

[0013] 본 발명은 신규한 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 이용하여 높은 생산성의 히알우론산을 생산할 수 있는 배지 조성을 제공하고자 한다.

[0014] 본 발명은 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 이용하여 고분자의 히알우론산을 생산하는 방법을 제공하고자 한다.

[0015] 본 발명은 용혈성이 없고 히알우로니다제 효소가 발현되지 않는 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 확보하고 이 균주를 이용하여 히알우론산 배양 조건을 최적화함으로써 경쟁력 있는 히알우론산을 생산할 수 있다. 구체적으로 본 발명은 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 이용하여 탄소원, 질소원, 기타 배지의 최적 농도를 결정하고 효율적인 배양 공정을 진행함으로써 고분자 히알우론산의 생산성을 최대로 증가시키는 방법을 제공한다.

**효과**

[0016] 본 발명에 따른 특정 배지원인 글루타민, 수산, 글루콘산나트륨이 포함된 조건에서 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 이용하여 히알우론산을 생산하면 고수율뿐만 아니라 고분자의 히알우론산을 생산할 수 있다. 또한 대량 발효 생산을 위해 75L 발효조에서 동일한 조건으로 히알우론산을 생산할 때도 동등 이상의 히알우론산이 생산되는 것으로 보아 본 발명은 산업상 이용 가능성도 매우 높다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0017] 본 발명은 고분자의 히알우론산을 고수율로 생산하기 위한 목적을 달성하기 위해서 필요한 비용혈성의 특징과

히알우로니다제가 발현되지 않는 스트렙토코쿠스 속 ID9102(KCTC11395BP)를 제공한다.

- [0018] 또한 본 발명은 고분자의 히알우론산을 고수율로 생산하기 위해서 스트렙토코쿠스 속 ID9102(KCTC11395BP)를 최적의 조건으로 배양하는 배지 조성 조건을 제공한다.
- [0019] 히알우론산을 생산하는 바람직한 배양 배지 조건으로 탄소원의 경우에는 글루코스, 전분, 만노오즈, 프락토즈, 갈락토즈 등을 사용할 수 있으며 이 중에서 글루코스가 가장 효과적인 탄소원이다. 질소원의 경우에 효모 엑스, 소고기 엑스, 펩톤, 소이톤, 카제인 펩톤 등이 사용 가능하며 바람직한 질소원은 카제인 펩톤이다.
- [0020] 본 발명에 따른 히알우론산 생산 배지의 바람직한 조성물은 글루코스 40-100g/l, 효모엑스 5-10g/l, 카제인 펩톤 5-20g/l, 아미노산 0.5-1g/l, 금속염 0.5-1.5g/l, 인산일수소칼륨 1-5g/l, 염화나트륨 2-10g/l, 기타 염류 0.1-1.0g/l의 농도로 조제하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 상기에 기술된 발명의 목적에 따라서 미생물에 의한 히알우론산을 생산하는 방법을 고안하였고 이 방법에 의해서 용혈성이 없고 히알우로니다제 효소가 발현되지 않는 균주에 의해 고분자 및 고수율로 히알우론산을 생산하도록 만든 것이 특징이다.
- [0023] 본 발명의 생산균주인 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 이용하여 히알우론산 생산용 배지 조성을 구체적으로 표현하자면 많은 탄소원 종류 중에서 글루코스 단독의 배지 조성에서 가장 바람직하며 60-100g/l의 농도 이내에서 가장 우수한 히알우론산 생산성을 보여 준다.
- [0024] 질소원의 경우에는 소고기 엑스와 박토 펩톤 그리고 카제인 펩톤에서 가장 우수한 히알우론산 생산 능력을 나타내며 특히 카제인펩톤 13g/l에서 가장 바람직한 결과를 나타내었다.
- [0025] 아미노산의 경우에는 미생물의 대사에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있으며 특히 D-fructose-6-phosphate에서 D-glucosamine-6-phosphate로 전환하는 데에 결정적인 촉매 역할을 하는 글루타민은 bacterial metabolism에서 UDP-N-acetylmuramate의 생성을 조절하기 때문에 결국 세포벽에 많은 영향을 주는 주요한 물질임에 틀림없고 히알우론산의 생성에 있어서도 글루타민 0.6g/l 조건에서 가장 바람직한 결과를 보여 주었다.
- [0026] 금속염의 경우에는 황산마그네슘과 염화마그네슘 만이 가장 바람직한 배지원으로 사용되었으며 0.2g/l 이상부터 히알우론산 생산 능력이 있으며 특히 0.2g/l-0.5g/l 농도에서 가장 바람직한 생산 능력을 보여주었다.
- [0027] 상기의 배지원을 포함하여 본 발명에서 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 미생물 대사에서 탄소원이나 에너지원으로 사용되는 oxidized C2인 수산이 포함된 배지원에서 히알우론산 생산성이 증가하는 것을 확인하였고 평균분자량도 높아지는 것을 보여주었다.
- [0028] 또한 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 글루코스의 산화물인 글루콘산나트륨이 함유된 배지에서 배양하면 히알우론산의 생산성이 증가하고 평균분자량도 높아지는 것을 알게 되었다.
- [0029] 따라서 본 발명은 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 배양하여 고분자의 히알우론산을 고수율로 생산하기 위해서는 배지 조성물에 글루타민과 수산 그리고 글루콘산나트륨을 포함시키는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 또한 배지 조성물의 배지 pH는 수산화나트륨 용액을 사용하여 7.0으로 일정하게 유지하고 배양 온도는 34℃로 유지한다.
- [0031] 본 발명에서 배양액 내에 존재하는 히알우론산 농도는 카바졸 방법(T. Bitter, *Anal. Biochem.*, 1962, **4**, 330-334)에 의해 확인하였다. 히알우론산의 평균 분자량은 겔 여과 크로마토그래피 방법(Narlin B. Beaty et al, *Anal. Biochem.*, 1985, **147**, 387-395)으로 구하였다. 분석 조건은 다음과 같다. 칼럼은 Toyo Soda TSK gel G6000PWXL을 사용하였으며 이동상은 150mM NaCl, 3mM Na2HPO4(pH7.0), 0.02% NaN2이다. Detection은 refractive index detector(Shodex)를 사용하였고 표준물질은 polyethylene oxide를 2 mg/ml 농도로 조제하여 사용하였다.
- [0032] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다.

- [0033] 단 하기의 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 범위가 실시예로 한정되어 지는 것은 아니다.
- [0034] <실시예 1> 스트렙토코쿠스 속 ID9102의 선별
- [0035] 스트렙토코쿠스 속의 비용혈성 균주를 선별하기 위한 방법은 다음과 같다.
- [0036] 3.7% 브레인하트인퓨전 50ml 액체 배지에서 히알uron산 생산 균주인 스트렙토코쿠스 슈에피데미쿠스를 24시간 동안 37℃에서 진탕 배양하였다. OD(600nm)가 0.3인 배양액에 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 처리를 수행하여 37℃에서 1시간 교반하여 사멸율 95%의 조건을 결정하였다. 10 mg/ml의 NTG로 처리된 배양액을 4000 rpm의 회전 속도로 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하고 50 mM Tris-maleate buffer (pH 8.0)로 3회 세척하였다. 이렇게 돌연변이 유도된 포자를 멸균된 생리 식염수로  $10^2 \sim 10^4$  개/ml이 되도록 희석한 후, 5% sheep blood가 포함된 브레인하트인퓨전 고체배지에 도말하여 37℃에서 배양시켜 적혈구를 파괴시킨 투명한이 없는 비용혈성 콜로니를 선택하였다. 그러나 용혈성이 재발되는 우려를 감안하여 이러한 비용혈성 콜로니에 대한 NTG 돌연변이를 반복적으로 수행하고 계대 배양에서 용혈성을 나타내지 않는 콜로니를 선정하였다.
- [0037] 확보된 비용혈성 균주 중에서 히알우로니다제 효소가 발현되지 않는 콜로니를 선별하기 위해서 cetylpyridinium chloride(CPC)의 성질을 이용하였다. CPC는 mucous membrane을 파괴시켜 불투명하게 만든다. 히알uron산은 점성 물질이기 때문에 CPC에 의해 파괴되어 불투명해진다. 이러한 방법을 이용하여 비용혈성 균주를 0.1% 히알uron산을 첨가한 브레인하트인퓨전 고체배지에서 하룻 동안 배양하고 그 상층에 10% CPC를 추가했다. 히알우로니다제 활성이 없는 콜로니 주변에 투명한이 없는 스트렙토코쿠스 속 ID9102를 선별하였다.
- [0038] 상기의 스트렙토코쿠스 속 ID9102는 2008년 9월 30일자로 생물자원센터(KCTC)에 기탁번호 KCTC11395BP로 기탁 완료하였다.
- [0039] <실시예 2> 히알uron산을 생산하기 위한 기본적인 조건 선정
- [0040] -72℃의 냉동기에서 보관된 배양액 4ml을 급속 해동시켜서 3.7% 보바인하트인퓨전 고체배지에서 37℃로 24시간 동안 배양한 후 가로×세로 1cm<sup>2</sup>의 면적으로 생육된 콜로니를 잘라 내어 3% 토드휴이트 브로스 멸균 액체배지(40 ml) 2개에 접종한다. 37℃, 120rpm에서 진탕 배양한 80ml을 1차 종균배양액으로 사용하였다. 대수 증식기 단계인 6시간 배양 상태에서 무균적으로 1차 종균액을 2.5ℓ 발효조 내에 들어 있는 3% 토드휴이트 브로스 1,800ml의 멸균 액체 배지(pH7.8)에 접종하였다. 배양 조건은 37℃, 350rpm, 0.5vvm이었고 24시간 동안 무균적으로 배양함으로써 2차 종균배양액으로 사용하였다. 이때 종료된 2차 종균 배양액은 6.6±0.2의 pH 상태를 유지하고 있으며 OD(600nm)는 0.35±0.05이어야 한다. 2차 종균배양액 140ml을 본배양 배지에 접종하여 24시간 동안 배양함으로써 발효조 임펠러의 회전 속도에 따른 히알uron산의 생산성의 차이를 관찰하였고 추후 히알uron산 생산성 증대를 위한 임펠러의 회전속도를 결정하였다. 이상의 배양 공정은 모든 실시예에서 동일하게 적용되었다.
- [0041] 히알uron산을 최적으로 생산하기 위한 본 배양 배지 결정 시험은 5ℓ 발효조에서 3.5ℓ 배양액 조건으로 실시하였다. 기본적인 배지 조성은 글루코스 60g/ℓ, 효모엑스 5g/ℓ, 카제인 펩톤 13g/ℓ, 황산마그네슘 0.7g/ℓ, 인산일수소칼륨 2.5g/ℓ, 염화나트륨 5g/ℓ, pH 7.0, 34℃의 조건으로 구성되었다.
- [0042] 발효조 임펠러의 회전 속도의 중요성은 산소와 영양분이 배지 전체에 골고루 섞이게 하여 균의 성장에 도움을 주는 역할을 하는데 회전 속도를 300-600rpm까지 다양하게 설정했을 때 ID9102의 배양 결과는 [도 2]와 같다.
- [0043] 300rpm에서는 배양 8시간부터 균의 본격적인 성장과 히알uron산의 생산이 시작되지만 상승 폭이 매우 낮았다. 하지만 400rpm이상의 조건에서는 정상적인 배양이 이루어 졌으며, 균체 증가 속도는 600rpm에서 가장 높게 나타났다. [도 2]의 결과처럼 300-600rpm의 비교 시에 500rpm에서 균체의 성장은 가장 낮았지만 히알uron산의 생산성은 가장 높은 것으로 확인되었으며 배양 16시간째에 3.69g/ℓ의 최대 생산성을 나타내는 것을 확인하였기에 이하 실시예의 시험에서 발효조의 임펠러 회전 속도는 500rpm으로 동일하게 사용하였다.
- [0044] <실시예 3> 글루타민의 첨가에 의한 히알uron산 생산성
- [0045] 실시예 2까지 결정된 배양 조건과 배지 조성을 기본으로 하고 글루타민을 0.6g/ℓ의 농도로 추가하여 배양을 수행하였다. 글루타민은 호기 배양시에 TCA 사이클 상의 많은 영역에서 대사산물의 증감에 관여하기 때문에 히알

우론산의 생합성에도 많은 기여를 할 수 있을 것으로 판단되었다. [표 1]처럼 글루탐산과 비교했을 때에 글루타민 단독 투여에 의한 히알우론산의 생산성이 4.83g/ℓ 로써 가장 우수한 것으로 확인하였다. 또한 글루타민 단독 투여에서 배양액의 점도가 1460cP로써 가장 높았으며 반대로 균체 증식량은 가장 낮은 것으로 확인되었다. 이것은 히알우론산의 생성과 균체 증식 관계는 상호 경쟁 관계에 있기 때문에 균체 증식과 히알우론산의 생산성은 반대의 결과를 보여주는 것이며 글루타민 0.06%는 히알우론산 생산 배지원으로 많이 사용하는 글루탐산보다도 적합한 히알우론산 생산 배지 조건임을 알 수 있었다.

[0046] 이하의 실시예에서는 글루타민 0.06%가 추가된 배지 조성을 사용하였다.

**표 1**

[0047] 글루타민이 히알우론산의 생산에 미치는 영향

배지 종류	히알우론산 농도(g/ℓ)	균체량(A600)	점도(cP)
글루탐산 (0.06%)	4.04±0.04	3.27	946
글루탐산+글루타민 (0.06%+0.06%)	4.48±0.03	2.28	1,220
글루타민 (0.06%)	4.83±0.02	2.08	1,460

[0048] <실시예 4> 수산이 히알우론산 생산에 미치는 영향

[0049] 실시예 3까지 결정된 배양 조건을 기본으로 하여 수산이 히알우론산의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 히알우론산의 생산에 특별한 영향을 미치는 배지원을 찾기 위해 삼각플라스크에서 다양한 종류에 대한 평가를 진행하였으며 수산의 첨가가 스트렙토코쿠스 속 ID9102의 히알우론산 생산에 미치는 영향이 가장 큰 것을 확인하였다. 5ℓ 발효조에서 실시예 3에 의해 결정된 배지 조건으로 하여 수산의 농도별에 따른 히알우론산의 생산성의 변화를 확인한 결과 [도 3]의 결과처럼 0.02%에서 가장 높은 6.25g/ℓ의 생산성을 확인하였다.

**표 2**

[0050] 수산 농도별에 따른 히알우론산의 생산성 차이

수산 농도(%)	균체량(A600)	히알우론산(g/L)	점도(cP)
0.01	2.15	3.88	1,380
0.02	2.02	6.25	1,670
0.05	2.34	5.44	1,190
0.1	2.01	4.43	1,080
0.2	1.85	2.79	480
0.4	1.66	2.43	420
0.6	1.72	1.53	210
0.8	1.58	0.98	180

[0051] 수산의 농도별에 따른 히알우론산의 생산성을 상세하게 [표 2]에 기술하였다. 균체량과 히알우론산의 생산은 비례하지 않는 것을 알 수 있으며 0.02%에서 가장 높은 생산성과 점도를 나타내지만 이 후로 감소하는 결과를 보여 주었기 때문에 수산 0.02%가 히알우론산의 생산에 바람직한 조건임을 알 수 있었다.

[0052] 이렇게 형성된 배양물을 조정제하여 겔 여과 칼럼크로마토그래프를 실시하여 배양물 내의 히알우론산의 평균분자량을 확인했을 때 [표 4]와 같은 결과를 보여주었다. 즉, 수산의 첨가에 따라 히알우론산의 생산성의 증가와 더불어 평균분자량은 약 490만 Da까지 증가하는 것을 알 수 있었다. 이것은 글루타민 배지원에 비해서 평균분자량이 약 92만 Da 증가한 수준이다. 결론적으로 수산을 배지에 첨가하면 생산성의 증가와 더불어 고분자의 히알우론산을 생산할 수 있는 것이다.

[0053] 이하의 실시예에서는 수산 0.02%가 추가된 배지 조성을 사용하였다.

[0054] <실시예 5> 글루콘산나트륨이 히알uron산 생산에 미치는 영향

[0055] 실시예 4까지 확보된 배양 조건을 기본으로 하여 글루콘산나트륨이 히알uron산의 생성에 미치는 영향을 확인하였다. [도 4]의 결과처럼 글루콘산나트륨 0.1%에서 히알uron산의 생산성이 7.56g/ℓ 까지 상승하는 것을 보여 주었다.

**표 3**

[0056] 글루콘산나트륨 농도별에 따른 히알uron산 생산성 차이

글루콘산나트륨(%)	균체량(A600)	히알uron산(g/L)	점도(cP)
0.01	2.56	5.19	1,575
0.02	2.58	5.23	1,560
0.05	2.61	6.79	1,815
0.1	2.79	7.56	2,220
0.2	2.93	4.21	1,905
0.4	2.92	4.19	1,560

[0057] 글루콘산나트륨의 농도에 따른 히알uron산의 생산성은 [표 3]에 상세히 기술하였다. 글루콘산나트륨 농도 0.01%에서 0.1%까지 히알uron산이 증가하는 양상을 보이며 이 후의 농도에서는 히알uron산의 생산성이 급격하게 하락하는 것을 알 수 있었으며 히알uron산의 최적의 생산 배지 조건은 글루콘산나트륨 0.1%가 포함되는 조건이라는 것을 알 수 있었다. 또한 글루콘산나트륨 0.1% 조건은 점도(2,220cP)의 상승까지 이루어지기 때문에 분자량의 상승을 기대할 수 있는 것이다.

**표 4**

[0058] 각 배양물의 히알uron산 생산성과 평균 분자량 분석 결과

	히알uron산(g/L)	Retention Time(m)	평균분자량(Da)
기본배지 배양물(실시예 2)	3.69	-	-
글루타민 첨가 배양물	4.83	7.200	3,969,269
수산첨가 배양물	6.25	7.096	4,890,111
글루콘산나트륨 첨가 배양물	7.56	7.069	5,162,285
기존 히알uron산 주사제	-	7.205	3,929,655

[0059] 또한 [표 4]의 결과는 글루콘산나트륨을 첨가했을 경우 수산의 첨가 배양물보다도 약 27만 Da의 평균분자량이 증가함으로써 히알uron산의 평균분자량이 500만 Da를 상회한다는 것을 보여주고 있으며 이 것은 기존의 히알uron산 주사제 제품보다도 약 100만 Da 이상의 고분자 상태의 히알uron산이 생산된다는 것을 알 수 있는 것이다.

[0060] 결론적으로 5ℓ 발효조에서 글루콘산 나트륨 0.1%의 배지 첨가 조건으로 7.56g/ℓ의 히알uron산 생산성과 평균 분자량은 약 516만 Da의 결과를 획득할 수 있었다.

[0061] <실시예 6> 스트렙토코쿠스 속 ID9102의 히알uron산 생산을 위한 배양 공정

[0062] 실시예 5까지 확보된 히알uron산 생산 배지 조건을 기본으로 하여 75ℓ 발효조에서 히알uron산을 생산하기 위해 실시예 2의 배양 공정을 적용하였으며 ID9102를 이용하여 75ℓ 발효조에서 히알uron산을 대량 생산하는 구체적인 조건은 다음과 같다.

[0063] -72℃의 냉동기에서 보관된 배양액을 3.7% 보바인하트인퓨전 고체배지에서 37℃로 24시간 동안 배양한 후 가로 ×세로 1cm<sup>2</sup>의 면적의 콜로니를 3% 토드휴이트 브로스 멸균 액체배지 40ml 2개에 접종하였다. 배양 6시간에 2.5ℓ 발효조 내에 들어 있는 3% 토드휴이트 브로스 1,800ml의 멸균 액체 배지(pH7.8)에 접종하였다. 배양 조건은

37℃, 350rpm, 0.5vvm이었고 24시간 동안 무균적으로 배양함으로써 2차 종균배양액으로 사용하였다. 이때 종료된 종균 배양액은 6.8의 pH 상태를 유지하고 있으며 600nm에서 측정된 배양액의 OD는 0.35였다.

[0064] 실시예 5까지 결정된 본배양 배지 40 l 를 121℃에서 30분 동안 멸균하고 2차 종균 배양액 1.6 l 를 무균적으로 접종하여 24시간 동안 34℃, 500rpm, 0.5vvm의 조건으로 일정하게 유지하였으며 특히 pH는 5N 수산화나트륨 용액을 이용하여 7.0 ± 0.2로 일정하게 유지하는 것이 바람직하다.

[0065] 상기의 기본적인 배양 조건을 바탕으로 하여 75 l 발효조에서 배양한 결과는 [도 5]에서 보여주었으며 배양 18시간째에 히알루론산 최대생산성(7.69g/l)을 나타내었으며 이 후로는 일정하게 유지하는 패턴을 보여주고 있다.

[0066] 특히 75 l 발효조에서 최적의 배양 조건의 설정으로 인하여 평균분자량은 약 590만 Da로써 5 l 발효조에서 보여 주었던 평균분자량보다 약 70만 Da 더 높은 분자량을 나타내었다.

### 도면의 간단한 설명

[0067] 도1은 D-glucuronic acid와 N-acetylglucosamine이 β-1,3과 β-1,4 결합을 이루는 히알루론산의 반복 단위를 보여주는 그림이다.

[0068] 도2는 5 l 발효조에서 각 agitation에 따른 히알루론산의 생산성을 나타내는 그래프이다.

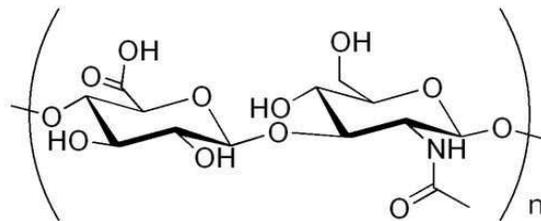
[0069] 도3은 5 l 발효조에서 수산의 농도별에 따른 히알루론산 생산성에 미치는 영향을 보여 주는 그래프이다.

[0070] 도4는 5 l 발효조에서 글루콘산나트륨 농도별에 따른 히알루론산 생산성에 미치는 영향을 보여 주는 그래프이다.

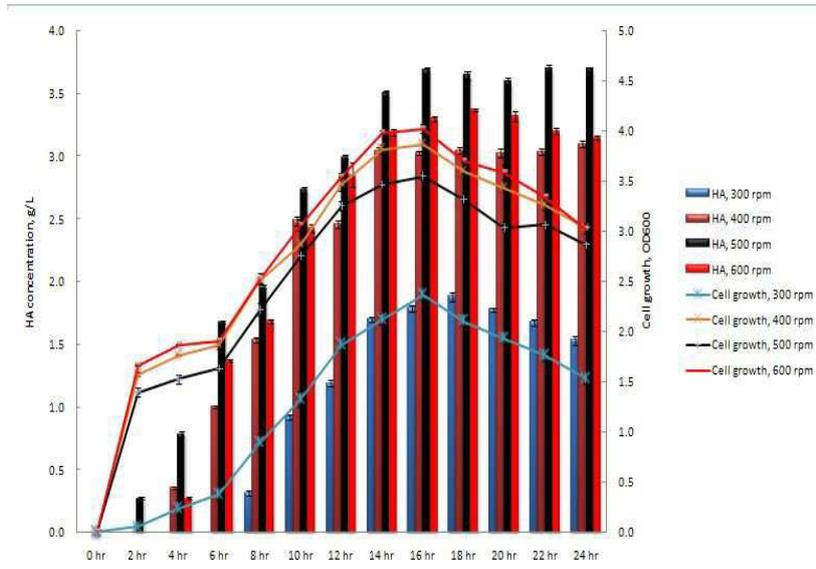
[0071] 도5는 75 l 발효조에서 ID9102에 의한 히알루론산 생산 프로파일을 보여 주는 그래프이다.

### 도면

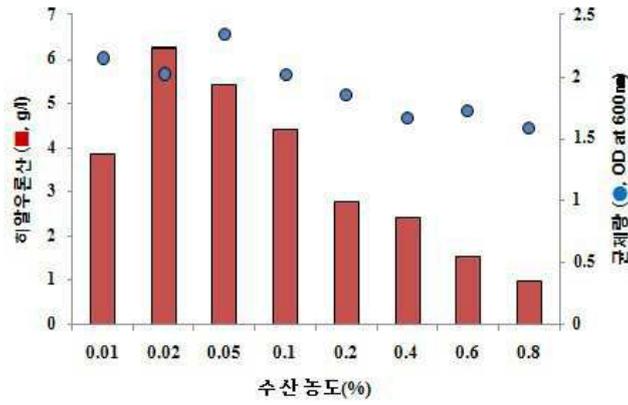
#### 도면1



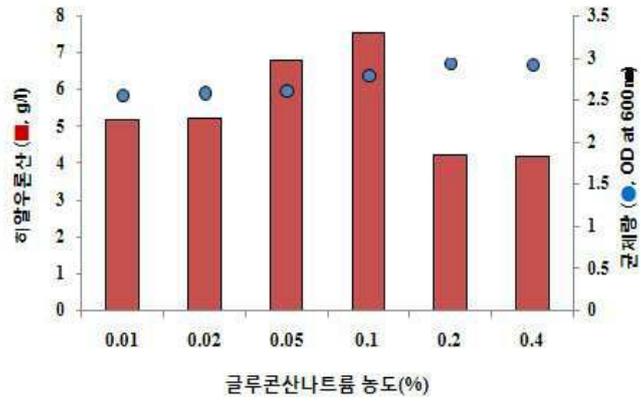
도면2



도면3



도면4



도면5

