



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월12일
 (11) 등록번호 10-1428508
 (24) 등록일자 2014년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 1/14 (2006.01) C12P 7/44 (2006.01)
 C12R 1/66 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0133893
 (22) 출원일자 2012년11월23일
 심사청구일자 2012년11월23일
 (65) 공개번호 10-2014-0066530
 (43) 공개일자 2014년06월02일
 (56) 선행기술조사문헌
 JP06038774 A
 WO2011041231 A1
 KSBB Journal 26: 229-236 (2011. 5. 13)
 KSBB Journal 24: 30~40 (2009)

(73) 특허권자
 한국생산기술연구원
 충청남도 천안시 서북구 입장면 양대기로길 89
 (72) 발명자
 김상용
 충남 천안시 서북구 시청로 73, 208동 804호 (불당동, 동일2차아파트)
 이도훈
 서울 서초구 서초중앙로 200, 16동 1503호 (서초동, 삼풍아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

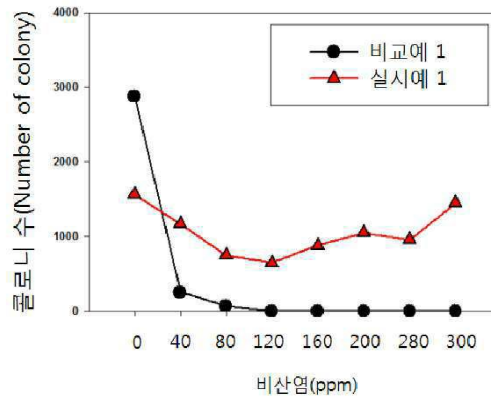
심사관 : 조현경

(54) 발명의 명칭 **아스퍼질러스 테리우스 및 이를 이용한 이타콘산의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 신규한 균주인 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP에 대한 것으로, 인산이 높은 농도로 함유된 배지에서도 인산을 세포 성장이 아닌 이타콘산 생산에 이용가능하여, 이타콘산의 생산성이 우수할 뿐 아니라, 대규모 생산 시설에서도 우수한 이타콘산 생산 효율을 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
신우식
 인천 남구 인하로 95, 301호 (용현동)
조진구
 경기 용인시 기흥구 용구대로2518번길 15, 209동
 701호 (보정동, 신촌마을포스홈타운1단지)

전계택
 강원 춘천시 공지로200번길 13, 101동 513호 (효자동, 동보아파트)
박선미
 강원 원주시 원문로 244, (단계동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 10F-N1-0012
 부처명 지식경제부
 연구사업명 에너지자원기술개발사업
 연구과제명 바이오매스 유래 중간 화학원료물질로서 이타콘산 생산을 위한 에너지절약형 통합공정 개발
 기 여 율 1/1
 주관기관 큐바이오텍(주)
 연구기간 2010.10.01 ~ 2012.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

공지의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) 를 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG)의 돌연변이원으로 처리한 후, 비산염(arsenate)이 포함된 배지에서 배양한후 비산염(arsenate) 저항성 균주를 선발하는 단계를 통하여 제조되는 것을 특징으로 하는,

아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP는 이타콘산을 생산하는 것인, 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP는 비산염(arsenate) 또는 인산 저항성을 갖는 것인, 제조방법.

청구항 4

A) 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP를 배양하는 단계; 및

B) 상기 A)단계의 배양액으로부터 이타콘산을 수득하는 단계를 포함하며,

상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP는,

a) 공지의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) 를 자외선 또는 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG)의 돌연변이원으로 처리하여 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 수득하는 단계;

b) 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 화학적 돌연변이원으로 처리하는 단계; 및

c) 상기 b)에서 처리된 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 비산염(arsenate)이 포함된 배지에서 배양한후 비산염(arsenate) 저항성 균주를 선발하는 단계를 통하여 제조되는 것을 특징으로 하는, 이타콘산의 제조 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP를 배양하는 단계에서의 배양액은, 배양액 총 중량에 대하여 인산을 0.02 g/L 내지 0.2g/L의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는, 이타콘산의 제조 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 4에 있어서, 상기 b) 단계의 화학적 돌연변이원은 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG)인 것을 특징으로 하는 이타콘산의 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) 및 이를 이용한 이타콘산의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 이타콘산(itaconic acid)은 메틸렌 그룹과 두개의 카르복실 그룹을 갖고 있어 이 두 그룹간의 결합을 이용하여 폴리에스터 수지 및 여러 고분자 물질의 합성에 필요한 중간물질로 첨가되며, 현재 섬유, 도색제, 세척제, 제초제 및 제약산업 등 많은 분야에 걸쳐 폭넓게 이용가능하다. 이타콘산은 1931년 처음 보고된 이후 지속적으로 생산 규모가 성장되어 왔으며, 이는 값싼 탄소원으로 높은 생산성을 나타내는 액상 배양을 통한 발효 방법이 정립되었기 때문이다.

[0003] 한편, 이타콘산의 생산은 크게 화학적 방법 및 생물학적 방법으로 나눌 수 있다. 화학적 방법으로는 이타콘산의 전구물질인 구연산(citric acid)이나 cis-아코니트산(cis-aconitic acid)을 가열 분해하여 이타콘산을 얻는 방법 등이 사용되나, 화학반응시 수반되는 여러 부작용 때문에 이타콘산의 산업적 생산은 생물학적 방법에 따라 미생물에 의한 생물배양 공정에 의해 수행되는 것이 보다 바람직하다. 이타콘산의 생산을 위한 생물학적 방법 관련, 1940년대 중반 이후 미국 농무부(USDA)의 이타콘산 생산에 관한 연구에 의하여 다양한 생물종이 검토되었으며, 이중 약 11종이 이론 수율의 45% 이상을 생산해 내고 있음을 발견하였다. 이에 현재까지도 많이 사용되고 있는 *Aspergillus terreus* NRRL1960 균주가 개발되게 되었다.

[0004] 또한, 1960년대에는 화이자(Pfizer) 등의 기업에서 이타콘산을 더욱 값싸게 생산하기 위해서 당밀(molasses)을 기반으로 한 발효 기술을 개발하였고, 현재에는 생전분(raw starch)을 탄소원으로 이용하기 위한 연구들도 진행되어 왔으며, 또한 공기부상반응(air-lift reactor)를 이용하여 이타콘산을 대량 생산하는 배양 공학적 접근도 시도되었다.

[0005] 그러나 위와 같은 여러한 시도에도 불구하고 이타콘산의 높은 생산성을 나타내는 균주 개발에는 한계가 있었으며, 특히 배지에 포함된 인산의 농도가 높아짐에 따라서 영양분의 소모를 세포 성장쪽으로 유도함으로써 이타콘산의 생산이 급격히 낮아지는 문제점이 있다. 또한, 정밀한 농도 조절이 어려운 대규모 배양에 있어서, 이타콘산의 생산성을 현저히 낮출 뿐만 아니라 연속식 배양 방법에 부적합한 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 일본 특허출원번호 제1992-196906호
- (특허문헌 0002) 미국 특허출원번호 제1992-855470호
- (특허문헌 0003) 미국 특허출원번호 제2000-510449호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은, 균체의 화학적 돌연변이를 통해서 신균주를 선별하여, 인산의 농도가 높은 배지에서도 이타콘산의 생산성이 증대될 뿐 아니라 대규모 배양이 가능한, 새로운 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) 균주를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 새로운 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) 균주의 배양을 통해 이타콘산을 높은 수율로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 새로운 균주인 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP를 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일예에 의하면, 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP는 이타콘산을 생산하는 것 일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 예에 의하면, 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP는 비산염(arsenate) 또는 인산 저항성을 갖는 것 일 수 있다.
- [0012] 또한 본 발명은 A) 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP를 배양하는 단계; 및 B) 상기 A)단계의 배양액으로부터 이타콘산을 수득하는 단계를 포함하는, 이타콘산의 제조 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일예에 의하면, 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP를 배양하는 단계에서의 배양액은, 배양액 총 중량에 대하여 인산을 0.02 g/L 내지 0.2 g/L의 농도로 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 예에 의하면, 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP는, a) 공지의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) 를 자외선 또는 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG)의 돌연변이원으로 처리하여 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 수득하는 단계; b) 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 화학적 돌연변이원으로 처리하는 단계; 및 c) 상기 b)에서 처리된 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 비산염(arsenate)이 포함된 배지에서 배양한후 비산염(arsenate) 저항성 균주를 선발하는 단계를 통하여 제조되는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 예에 의하면, 상기 b) 단계의 화학적 돌연변이원은 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG)인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 화학적 돌연변이를 통해 선별된 새로운 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)로서, 인산이 높은 농도로 함유된 배지에서도 인산을 세포 성장이 아닌, 이타콘산 생산에 이용 가능하며, 이타콘산의 생산성이 우수하다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 새로운 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)의 배양을 통해 높은 수율로 이타콘산의 생산이 가능하며, 대규모 생산 시설에서도 우수한 효율을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 실시예 1의 균주 및 비교예 1의 균주의 비산염 농도에 따른 콜로니수를 나타내는 그래프이다.
 도 2는 기존의 생산 배지(인산(phosphate) 0.02g/L)에서 생산배양을 한 경우 실시예 1 및 비교예 1의 균주의 이타콘산 생산량을 나타낸 그래프이다.
 도 3은 생산 배지(인산(phosphate) 0.02g/L)에서 생산배양을 한 경우 실시예 1 및 비교예 1의 건세포중량을 나타낸 그래프이다.
 도 4는 고농도 인산 함유 생산 배지(인산(phosphate) 0.2g/L)에서 생산배양을 한 경우 실시예 1 및 비교예 1의 균주의 이타콘산 생산량을 나타낸 그래프이다.
 도 5는 5L 발효조를 사용하여 고농도 인산 함유 생산 배지(인산(phosphate) 0.2g/L)에서 생산배양을 한 경우 실시예 1 및 비교예 1의 균주의 이타콘산 생산량을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 새로운 균주인 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP에 대한 것이다. 본 발명의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP가 세포외로 분비하는 유기산 중 하나가 이타콘산이므로 이타콘산을 생산을 위하여 활용 가능하다. 특히, 본 발명의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP는 고농도의 인산이 첨가된 이타콘산 생산 배지에서도 높은 효율로 이타콘산을 생산하여,

그 활용가치가 매우 클 것으로 기대된다.

- [0020] 본 발명의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP는, 기존에 알려진 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) 균주를 변형하여 제조할 수 있다.
- [0021] 구체적으로, 기존에 알려진 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) 균주의 포자에 MNNG를 이용하여 돌연변이를 유도하고, 상기 돌연변이체들을 인산 유사체인 비산염(arsenate)이 첨가된 고체배지(PDA: potato-dextrose agar)에서 재생하여 비산염(arsenate)에 대한 저항성이 높은 균주들을 선별함으로, 본 발명의 신균주인 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP를 제조할 수 있다.
- [0022] 보다 구체적으로, 본 발명의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP는,
- [0023] a) 공지의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)를 자외선 또는 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG)의 돌연변이원으로 처리하여 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 수득하는 단계;
- [0024] b) 상기 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 화학적 돌연변이원으로 처리하는 단계; 및
- [0025] c) 상기 b)에서 처리된 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 비산염(arsenate)이 포함된 배지에서 배양한 후 비산염(arsenate) 저항성 균주를 선별하는 단계를 통하여 제조되는 것일 수 있다.
- [0026] 상기 a) 단계의 공지의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)는 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)(ATCC10020)일 수 있다.
- [0027] 상기 b) 단계의 화학적 돌연변이원은 N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG)일 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 신균주 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP는 플라스크 배양을 통하여 그 배양액으로부터 이타콘산을 높은 효율로 생산 가능할 뿐 아니라, 5L 발효기 배양 등을 이용한 대량생산에 이용할 수 있다.
- [0029] 특히, 본 발명의 신균주 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP는 비산염 저항성을 나타내며, 인산이 고농도로 함유된 배지에서도 현저히 우수한 이타콘산 생산능을 나타낸다. 배양액 총 중량에 대하여 인산을 0.02 g/L 내지 0.2 g/L의 농도로 포함하는 배양액 에서도 우수한 비산염 저항성을 나타낸다. 실제로, 본 발명자는 종래의 생산배지보다 인산의 함량이 10배 증대된 열악한 생산 배지에서도 본 발명의 신균주 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP가, 모균주에 비해서 플라스크 배양에서는 이타콘산의 생산이 36%, 5L 발효조에서는 40% 증대된 결과를 나타냄을 확인하였다. 이 점은 기존 아스퍼질러스 테리우스 균주의 경우, 인산의 농도가 높은 배지에서 영양분의 소모를 세포 성장쪽으로 유도함으로써 이타콘산의 생산이 급격히 낮아지는 문제점을 크게 개선한 것으로, 본 발명의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC 12234BP의 매우 우수한 효과이다.
- [0030] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] **<참조예 1: 균주의 보관>**

[0032] 본 실험에서는 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)(ATCC10020)(KTCC)로부터 돌연변이를 통하여 제조한 R104균주를 모균주로 사용하였으며 균주보관은 포자 형성배지인 PDA(potato dextrose agar) 플레이트에 접종하여 7일 동안 28℃에서 배양한 후 20% 글리세롤에 현탁한 후 -80℃에서 보관하였고, 필요시마다 꺼내어 PDA 배지에 100 μl씩 도말하여 사용하였다.

[0033] **<참조예 2: 배지 및 배양 조건>**

[0034] 본 발명에서 사용된 배지는, 사용 목적에 따라 포자 형성배지, 액상 성장배지, 액상 생산배지로 구분하여 사용

하였다.

[0035] 구체적으로 포자 형성배지는 PDA(potato dextrose agar) 20 g/l 를 사용하였고, 액상 성장배지는 글루코스 (glucose) 55 g/l, 효모 추출물(yeast extract) 2 g/l, 질산 암모늄(ammonium nitrate) 6 g/l, 제이인산칼륨(potassium phosphate dibasic) 0.02 g/l, 및 황산 마그네슘(magnesium sulfate) 2 g/l 가 포함된 배지를 사용하였고, 액상 생산배지는 글루코스 112 g/l, 염화 칼슘(calcium chloride) 3.75 g/l, 황산 암모늄 (ammonium sulfate) 2.86 g/l, 제이인산칼륨(potassium phosphate dibasic) 0.06 g/l, 황산 마그네슘 (magnesium sulfate) 0.5 g/L, CuSO₄·7H₂O 0.00085mg/L, 및 MnCl₂·4H₂O 0.0000219mg/L를 포함하며 pH 2.1인 배지를 사용하였다.

[0036] 본 발명의 배지는, 습식 멸균 시 침전과 갈변현상을 방지하기 위해 배지의 당과 무기염류는 농축용액으로 만들어 멸균한 뒤 무균상태에서 나머지 배지 용액과 혼합하여 사용하였다. 플라스크를 이용한 생산 배양 시 성장 배양은 포자 형성배지인 PDA에 균을 접종 후 28℃에서 7일간 배양하여 형성된 포자를 평균으로 사용하였으며 이 포자를 20% 글리세롤이 포함된 증류수로 회수하여 40 ml의 성장배지가 들어있는 250 ml 플라스크에 5%(v/v)의 부피로 접종하였다. 그리고 이를 진탕 배양기를 이용하여 37℃, 220 rpm에서 2일간 배양하였다. 생산 배양은 성장배양에서 얻은 균사체를 40 ml의 생산배지가 들어있는 250 ml 플라스크에 5%(v/v)의 부피로 접종하여 37℃, 230 rpm에서 3 ~ 4 일간 배양하였다.

[0037] <참조예 3: 이타콘산의 분석 방법>

[0038] 배양액의 이타콘산을 측정하기 위해 진탕 배양된 혼합물을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였고, 이물질이 제거된 상등액 600 μl를 0.45 μm의 마이크로필터에 통과시킨 후 이를 HPLC 정량분석시료로 이용하였다. HPLC를 이용한 이타콘산의 분석 조건은 다음과 같다:

[0039] 컬럼(column): Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5μm) (Kanto chemical Co. INC)

[0040] 이동상(mobile phase): 20mM sulfuric acid

[0041] 온도: 40℃

[0042] 검출기: M720 absorbance detector (Younglin Co. Korea)

[0043] 검출과장: 210 nm

[0044] 이동상 속도: 1.2 ml/min

[0045] 시료 분석량: 20 μl

[0046] <실시예 1: 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP)의 제조>

[0047] (1) 모균주(아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)R104)의 준비

[0048] 본 실험에서는 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)(ATCC10020)(KTCC)로부터 돌연변이를 통하여 제조한 R104균주를 모균주로 사용하였으며 균주보관은 포자 형성배지인 PDA(potato dextrose agar) 플레이트에 접종하여 7일 동안 28℃에서 배양한 후 20% 글리세롤에 현탁한 후 -80℃에서 보관하였고, 필요시마다 꺼내어 PDA 배지에 100 μl씩 도말하여 사용하였다.

[0049] 구체적으로, 상기 R104 균주는, MNNG를 이용하여 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)(ATCC10020)(KTCC)를 돌연변이 시키고 랜덤 스크리닝을 통하여 이타콘산을 다량으로 생산하는 균주를 HPLC로 분석하여 선별하는 과정을 순차적으로 반복하여 수득하였다.

[0050] 즉, 포자형성 배지인 PDA(potato dextrose agar)에서 자란 상기 스페질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)(ATCC10020)(KTCC)의 포자를 20%의 글리세롤이 포함된 증류수로 수거한 후 여과하여, 잔여물이 제거된 순수 포자 현탁액을 준비하였다. 상기 수거한 포자를 0.1 M TM buffer(pH 6.8)로 두 번 세척한 후 헤모사이토미

터(hemocytometer)를 이용하여 1×10^6 (spores/ml)로 희석하였다. 0.1 M TM buffer의 포자 현탁액에 전체 농도가 1,000 ppm이 되도록 MNNG를 첨가한 후 28°C에서 15분간 처리하였다. 또는 상기에서 잔여물이 제거된 순수 포자 현탁액에서 포자의 농도를 1×10^6 (spores/ml)로 희석한 후 UV 자외선을 처리(UV처리를 통하여 99%의 포자를 사멸 시킴)하였다. 처리 후에는 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm에서 포자를 회수한 다음 0.1 M TM 버퍼로 2번 세척하였다. 상기 회수한 포자 현탁액의 포자 농도를 TM buffer를 이용하여 $1 \times 10^{4-6}$ (spores/ml)로 희석한 다음 희석된 포자 현탁액 0.1 ml을 PDA 배지 25 ml에 도말하였다. 이를 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 성장한 콜로니들을 선별하였다. 성장한 콜로니들을 이타콘산 생산용 액상 생산배지에서 각각 배양한 후 HPLC로 분석하여, 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) (ATCC10020) (KTCC) 보다 생산성이 증대된 R104 균주를 선별하였다.

[0051] (2) 모균주의 돌연변이 유도

[0052] N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)을 사용하여 다음과 같은 방법으로 상기 (1)에서 수득한 모균주에 돌연변이를 유도하였다.

[0053] 포자형성 배지인 PDA(potato dextrose agar)에서 자란 상기 (1)의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104의 포자를 20%의 글리세롤이 포함된 증류수로 수거한 후 여과하여, 잔여물이 제거된 순수 포자 현탁액을 준비하였다. 상기 수거한 포자를 0.1 M TM buffer(pH 6.8)로 두 번 세척한 후 헤모사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 1×10^6 (spores/ml)로 희석하였다. 0.1 M TM buffer의 포자 현탁액에 전체 농도가 1,000 ppm이 되도록 MNNG를 첨가한 후 28°C에서 15분간 처리하였다. 처리 후에는 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm에서 포자를 회수한 다음 0.1 M TM 버퍼로 2번 세척하였다.

[0054] (3) 비산염(arsenate) 저항성 균주 선별

[0055] 비산염은 인산염과 구조적으로 매우 유사한 물질이다. 만약 인산염을 배양으로부터 아주 쉽게 흡수하는 균주가 있다면, 이 균주는 인산염이 배양액에 있을 경우 인산염을 흡수한 후 이타콘산의 생성에 인산염을 사용하는 것이 아니라 세포의 성장에만 사용하는 경향이 있다. 따라서 이런 균주들은 이타콘산의 생산성이 낮다. 따라서 균주 선별시 비산염을 첨가할 경우 인산염을 좋아하는 균주들은 비산염을 인산염으로 혼동하여 흡수하게 된다. 그러나 비산염은 인산염과 구조적으로만 유사할 뿐 독성이 매우 강하기 때문에 비산염을 많이 흡수하는 균주들은 죽게 되는 반면 다량의 비산염들이 있어도 이를 잘 이용하지 않는 경우의 균주들은 비산염에 대하여 저항성이 있다고 말할 수 있으며 이 균주들은 배양액에 인산염이 있어도 흡수하는 속도가 느리거나 다른 방법으로 인산염을 이용하기 때문에 세포의 성장은 늦추고 이타콘산의 생산을 늘리는 경우가 많다. 따라서, 인산 이타콘산 생산성이 높은 인산 저항성 균주를 찾기 위해, 비산염 저항성 균주를 다음과 같이 선별하였다.

[0056] 상기 (2)에서 회수한 포자 현탁액의 포자 농도를 TM buffer를 이용하여 1×10^6 (spores/ml)로 희석한 다음 희석된 포자 현탁액 0.1 ml을 PDA(최소 배지 + 비산염(arsenate) (0~300 ppm)) 배지 25 ml에 도말하였다. 이를 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 성장한 콜로니들을 선별하였다. 성장한 콜로니들중 육안으로 관찰하였을 때, 콜로니의 성장 속도가 빠른 상위 10%을 미리 준비해 둔 agar slant (PDA)에 하나씩 옮긴 후 포자를 형성하였고 생성된 포자를 이타콘산 생산을 위한 포자현탁액으로 이용하였다.

[0057] <비교예 1: 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104의 제조>

[0058] 상기 실시예1의 (1)과 동일한 방법으로, 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104을 제조하였다.

[0059] <실험예 1: 본 발명의 신균주의 비산염 저항성 확인 실험>

[0060] 상기 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP 및 상기 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104의 비산염(arsenate) 저항성 민감도를 시험하기 위하여, 상기 실시예 1 및 비교예 1의 포자 현탁액을 얻은 후, PDA 배지에 비산염이 각각 0~300 ppm 첨가된 PDA 고체배지를 만든 후 1

$\times 10^6$ (spores/ml)로 희석된 포자 현탁액 0.1 ml을 비산염이 포함된 PDA 배지에 도말하였다. 비산염 첨가에 따른 콜로니수를 측정하여 도 1에 나타내었다.

[0061] 도 1에 의하면, 상기 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104균주의 경우 비산염의 첨가에 따라 콜로니 수가 급격히 감소하여 비산염이 80 ppm 이상인 경우 콜로니 수가 관찰되지 않았으며(최소 저해 농도가 80 ppm), 이에 비하여 본 발명의 신규주인 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP 균주의 경우 비산염의 농도가 300ppm 이상 증가하더라도 여전히 콜로니를 형성하는 것이 관찰되었다.

[0062] 따라서 본 발명의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP균주의 경우, 종래의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104에 비해 비산염에 대한 저항성이 매우 우수한 신규주이며, 인산이 고농도로 첨가된 생산 배지에서도 높은 이타콘산 생산능을 나타낼 것임을 알 수 있다.

[0063] **<실험예 2: 생산 배지의 인산 농도에 따른, 본 발명의 신규주의 이타콘산 생산성 확인 실험 (플라스크 배양)>**

[0064] 상기 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP 및 상기 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 플라스크 배양할 경우, 생산 배지의 인산 농도에 따른 이타콘산 생산성을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

[0065] 플라스크를 이용한 생산배양시 성장배양은 포자 형성배지인 PDA(potato-dextros agar)에 상기 실시예 1 및 비교예 1의 균주를 접종 후 37°C에서 7일간 배양하여 형성된 포자들을 20% 글리세롤이 포함된 증류수로 회수하여 40ml의 성장배지가 들어있는 250 ml 플라스크에 5%(v/v)의 부피로 접종한 후, 이를 진탕배양기에서 37°C, 200 rpm으로 2일간 배양하였다.

[0066] 생산배양은 성장배양에서 얻은 균사체를 40ml의 생산배지가 들어있는 250 ml flask에 5% (v/v)의 부피로 접종하여 37°C, 220 rpm으로 3~4일간 배양하였다. 이 때, 상기 참조예 2의 기존의 생산 배지(인산(phosphate) 0.02g/L) 및 인산의 농도가 10배 높아진 고농도 인산 함유 생산 배지(인산(phosphate) 0.2g/L)를 이용하여 각각 생산배양하였다. 시간에 따른 이타콘산의 생산량 및 각 균주의 건조세포중량을 도 2 내지 도 4에 나타내었다.

[0067] 도 2는 기존의 생산 배지(인산(phosphate) 0.02g/L)에서 생산배양을 한 경우 실시예 1 및 비교예 1의 균주의 이타콘산 생산량을 나타낸 그래프이다. 또한, 도 3은 생산 배지(인산(phosphate) 0.02g/L)에서 생산배양을 한 경우 실시예 1 및 비교예 1의 건조세포중량을 나타낸 그래프이다.

[0068] 도 2를 참고하면, 인산의 농도가 낮은 기존 생산 배지에서, 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP균주의 경우 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104균주에 비하여 약 6g/L 높은 이타콘산의 생산성을 나타냄을 알 수 있다. 이는 본 발명의 신규주인 실시예 1의 경우, 배지에 첨가된 인산이 세포의 성장을 위해 유도되는 것이 아니라 이타콘산의 생산에 사용되기 때문이다. 이 점은 도 3에서 실시예 1과 비교예 1의 건조세포중량을 측정해 본 결과, 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104균주에 비하여 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP 균주의 경우 약 5g/L의 낮은 결과값을 갖는 것을 통해 알 수 있다.

[0069] 한편, 도 4는 고농도 인산 함유 생산 배지(인산(phosphate) 0.2g/L)에서 생산배양을 한 경우 실시예 1 및 비교예 1의 균주의 이타콘산 생산량을 나타낸 그래프이다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 기존 생산배지에 비하여 인산의 양을 10배로 늘린 고농도 인산 함유 생산 배지의 경우에는, 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104균주의 생산성이 인산이 0.02 g/L첨가된 조건에 비해 약 30% 감소된 19g/L을 보인 반면, 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP균주의 경우에는 인산의 농도가 10배 높아졌음에도 불구하고 인산의 농도에 관계없이 거의 유사한 이타콘산 생산성을 나타냈다. 따라서 돌연변이를 통하여 선별된 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*)KCTC12234BP균주의 경우 인산의 고농도 첨가에 의한 이타콘산의 생산성 감소를 크게 회복시킬 수 있는 균주임을 알 수 있다.

[0070] <실험예 3: 본 발명의 신규주의 대량 배양 적합성 확인 실험>

[0071] 상기 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP 및 상기 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104를 대량 배양시 적합성을 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다.

[0072] 5L 발효조 배양은 탑 드리븐(top driven) 배양기를 이용하여 수행하였다. 5L 발효기(Best Korea)는 2개의 터빈 임펠러(6개의 blade(D=85mm)), 3개의 배플(폭=14mm), 12홀 스파저 (D=78mm)를 장착하였으며 탱크 지름은 165mm, working volume은 3.5L 로써 배양액의 높이는 155mm로 하였으며, pH(Mettler-Toledo, Switzerland), DO 프로브(DO probe, Mettler-Toledo, Switzerland)를 컴퓨터에 연결하여 온라인 모니터링 하였다.

[0073] 종균 접종을 위해서 사면한천으로부터 7일간 배양된 포자를 20% 글리세롤로 회수한 뒤 250ml 플라스크(working volume: 40ml)에 5% 접종하여 2일간, 37℃에서 1차 성장 배양하였으며 균사형태로 자란 배양액을 500ml 플라스크(working volume: 200ml)에 5% 접종하여, 상기 실험예 2의 성장 배양과 동일한 방법으로 배양 하였다. 이를 발효기를 위한 종균 배양으로 하였으며 발효기에 4.5%로 접종하였다. 발효기의 배양 온도는 37℃로 하였다. 이때 상기 실험예 2의 고농도 인산 함유 생산 배지(인산(phosphate) 0.2g/L)를 이용하여 생산배양하였다. 실시예 1 및 비교예 1의 균주의 이타콘산 생산량 및 배양 파라미터들을 도 5와 표 1에 각각 나타내었다.

[0074] 도 5는 5L 발효조를 사용하여 고농도 인산 함유 생산 배지(인산(phosphate) 0.2g/L)에서 생산배양을 한 경우 실시예 1 및 비교예 1의 균주의 이타콘산 생산량을 나타낸 그래프이다. 도 5에 나타낸 바와 같이 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP균주의 경우 인산이 0.2 g/L첨가된 생산 배지 조건에서 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104균주에 비하여 약 40%(111.5시간)증가된 이타콘산의 생산능을 나타냄을 알 수 있다. 즉 인산 또는 비산 저항성 균주인 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP균주의 경우, 인산에 의한 이타콘산 생산 억제 현상이 크게 낮아짐에 따라 비교예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) R104균주에 비하여 이타콘산 생산량 증가에 큰 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0075] 즉, 일반적으로 인산이 제한 성분으로 첨가되고 있는 비균형적 생산배지에서 인산의 농도를 높일 경우에는 첨가된 인산에 의해 배지 성분이 세포의 성장 및 생장으로 사용되는 것에 반하여, 본 발명의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP 균주의 경우 높은 인산 농도에도 불구하고 인산의 이용이 세포성장 보다 이타콘산 생합성으로 대사합성이 유도됨을 알 수 있다.

[0076] 또한 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 실시예 1 및 비교예 1의 균주의 배양 파라미터들을 비교해 보면 실시예 1의 아스퍼질러스 테리우스 (*Aspergillus terreus*) KCTC12234BP균주의 경우 최대 이타콘산 생산성은 40%, 평균 비생산 속도는 70%, 세포당 이타콘산 생산율은 57% 증대하였고 최대 건조세포중량은 33%, 평균 비성장 속도는 33% 감소됨을 확인할 수 있다.

표 1

	실시예 1	비교예 1
P_f (최대 이타콘산 생산성, g/L)	44.95	26.17
X_f (최대 건조세포중량, g/L)	13.79	20.56
r_p (평균생산 속도, g/L/hr)	0.403	0.287
q_p (평균비생산 속도, g/g/hr)	0.12(72h)	0.035(64h)
r_x (평균 성장속도, g/L/hr)	0.123(111.5h)	0.184(111.5h)
μ_x (비성장속도, 1/hr)	0.037(24h)	0.042(91h)
$Y'_{p/x}$ (세포당 이타콘산 생산율, g/g)	4.33	1.98

수탁번호

[0078]

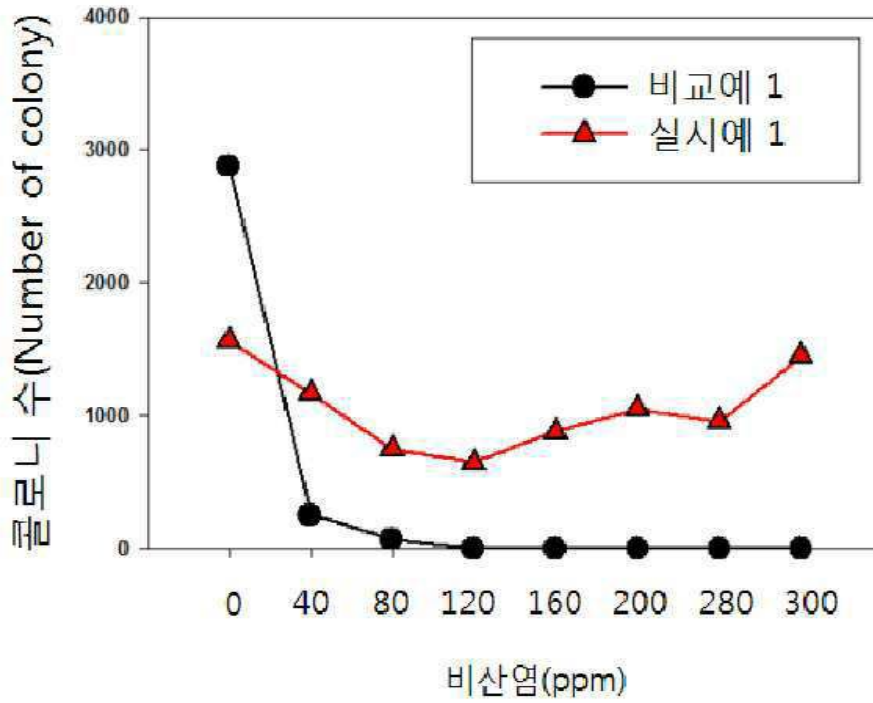
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC12234BP

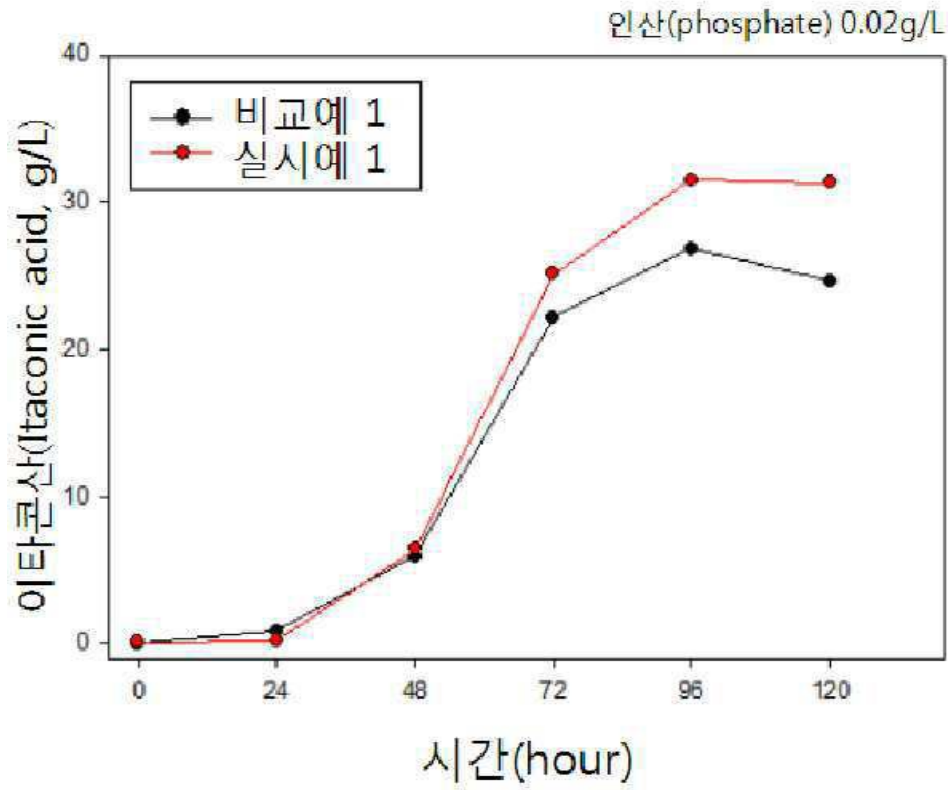
수탁일자 : 20120703

도면

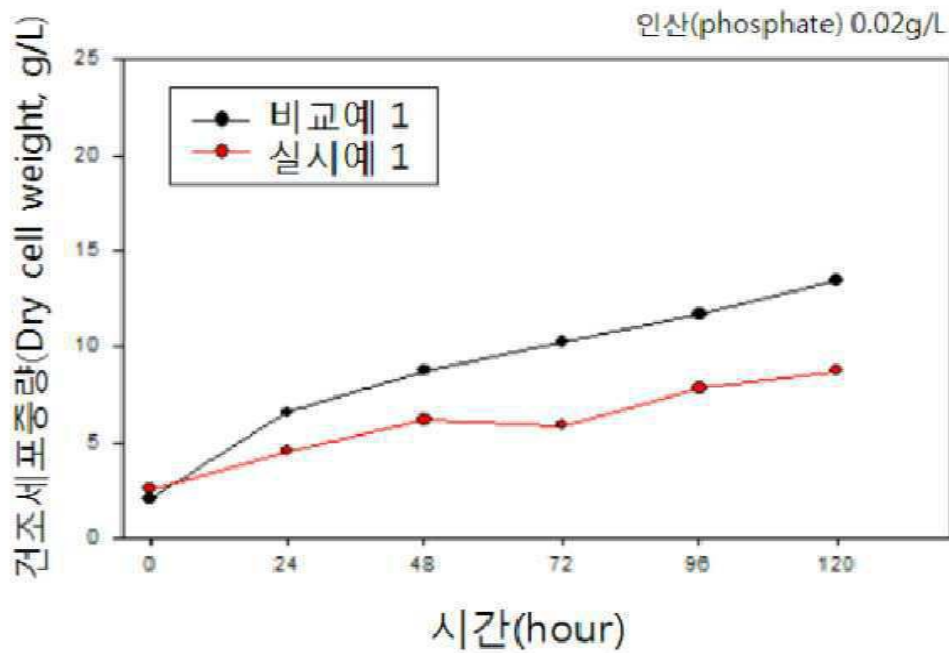
도면1



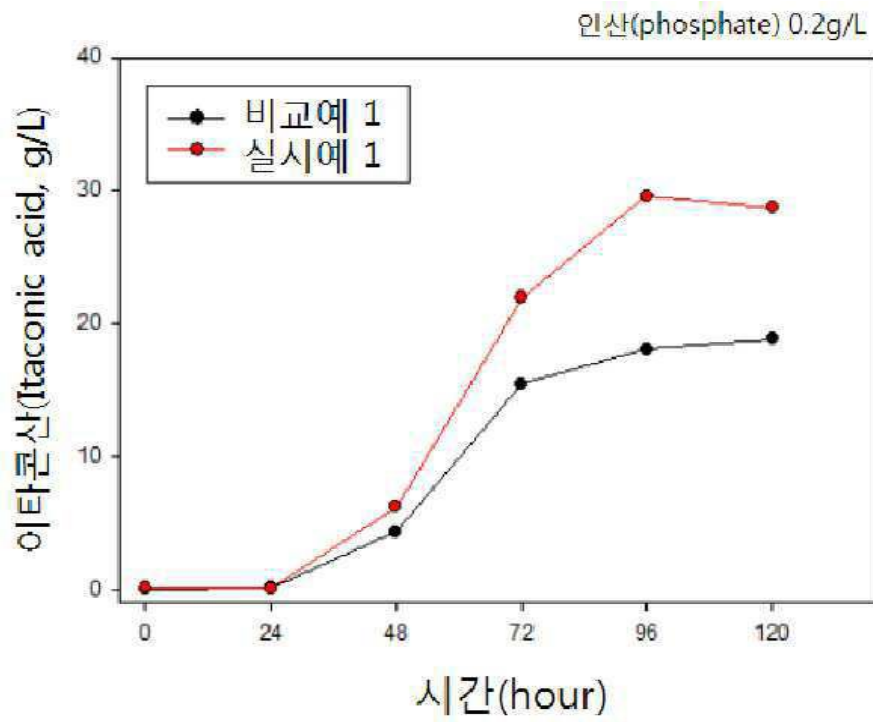
도면2



도면3



도면4



도면5

