

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0088777 (43) 공개일자 2011년08월04일
(51) Int. Cl. <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12P 7/40</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0008443 (22) 출원일자 2010년01월29일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교 한국과학기술원 대전 유성구 구성동 373-1 (72) 발명자 이진원 서울특별시 송파구 방이동 89올림픽선수,기자촌아파트201-1601호 오영훈 서울특별시 마포구 연남동 229-62번지 4층 이상엽 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212동 702호 (74) 대리인 양부현	

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 숙신산 생산 균주의 배양 방법

(57) 요약

본 발명은 숙신산 발효 균주의 숙신산 생산 수율을 증가시키기 위한 배양배지의 구성 함량 결정방법에 관한 것이다. 본 발명은 다양한 화합물의 핵심 전구체인 숙신산을 친환경적이면서도 효율적인 공정을 통하여 대량생산할 수 있는 새로운 미생물 발효공정에 유용하게 이용될 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090065580

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 미래기반기술개발사업

연구과제명 고효율 맨하이미아 균주를 이용한 숙신산 생산 공정의 생산성 극대화 기술 개발

기여율

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2011년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 숙신산 생산 균주 배양 배지의 아미노산 조성 결정 방법:

- (a) 자연계의 20가지 아미노산 중 1가지 또는 2가지 이상의 아미노산을 포함하는 배지에서 숙신산 생산 균주를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양 균주 내의 NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도를 정량하는 단계, NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도가 대조균 균주보다 증가하는 경우에는 상기 1가지 또는 2가지 이상의 아미노산의 조합은 상기 균주의 숙신산 생산 효율 증가를 위해 배양 배지에 첨가되는 아미노산 또는 그 조합으로 판단한다.

청구항 2

다음의 단계를 포함하는 숙신산 생산 균주 배양 배지의 질소원 함량 결정 방법:

- (a) 증가된 질소원 함량을 가지는 배지에서 숙신산 생산 균주를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양 균주 내의 NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도를 정량하는 단계, NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도가 대조균 균주보다 증가하는 경우에는 상기 증가된 질소원의 최종 함량은 상기 균주의 숙신산 발효 생산 증가를 위해 배양배지에 포함되는 질소원의 함량으로 판단한다.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 질소원은 질산염, 아미노산, 효모추출물(yeast extract), 쏘이톤(soytone), 펩톤(peptone), 트립톤(tryptone), 맥아추출물(malt extract), 황산암모늄(ammonium sulphate) 및 탈지분유(skim milk)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 질소원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 질소원은 효모추출물(yeast extract) 또는 황산암모늄(ammonium sulphate)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 숙신산 생산 균주 배양 배지의 탄소원 함량 결정 방법:

- (a) 증가된 탄소원 함량을 가지는 배지에서 숙신산 생산 균주를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양 균주 내의 NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도를 정량하는 단계, NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도가 대조균 균주보다 증가하는 경우에는 상기 증가된 탄소원의 최종 중량비는 상기 균주의 숙신산 생산 효율 증가를 위해 배양배지에 포함되는 탄소원의 함량으로 판단한다.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 탄소원은 수크로스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 아라비노스, 말토스, 락토스, 사과산, 구연산 및 주석산으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 탄소원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 탄소원은 글루코스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 숙신산 생산 균주는 맨하이미아 속(*Mannheimia* genus) 균주인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 숙신산 생산 균주의 최적의 배양 조건을 결정함으로써 궁극적으로 숙신산 수율을 최대화 하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 4개의 탄소원으로 이뤄져있고 2개의 카르복실기를 갖는 숙신산(succinic acid)은 호박으로부터 얻었다고 하여 호박산이라고도 불린다. 숙신산은 계면활성제, 의약품 및 음식 첨가제, 산업적으로 중요한 여러 가지 화합물의 전구체로써 널리 이용되고 있다. 1,4-부탄디올, N-메틸 피롤리딘, 숙신산염, 테트라하이드로퓨란, PBS(polybutyrate succinate)와 폴리아마이드 등과 같은 화합물이 숙신산으로부터 생산되는 대표적인 물질들이다. 또한 청정용매의 원료로도 각광받으면서 막대한 시장 규모를 이룰 것으로 기대되고 있다.

[0003] 숙신산을 생산하는 방법은 크게 전통적인 석유화학기반 공정과 미생물 발효 공정을 이용하는 두 가지 방법이 있으며, 현재 산업적으로 이용되는 대부분의 숙신산은 거대 화학회사에서 전통적인 화학공정을 통해 생산되고 있다. 그러나 화석 연료가 고갈되고 있고 화학공정에서 발생하는 온실 가스를 비롯한 여러 가지 환경 오염 물질 등으로 인해 생물 공정으로 숙신산을 생산하기 위한 많은 연구가 진행되었다. 지난 연구와 노력의 결과로 현재는 미생물 발효 공정을 통한 숙신산의 생산이 전통적인 화학공정에 대해 경쟁력을 가질 정도로 발전되었다.

[0004] 숙신산 발효 공정에서 달성하고자 하는 궁극적인 목표는 경제적 친환경적인 생물 공정을 통해 많은 양의 숙신산을 생산하는 것이다. 일반적으로 미생물 발효 공정에서 생산 수율과 생산량을 증대시키기 위해 두 가지 접근법이 가능하다. 그 첫번째는 하나의 작은 생산 공장이라고 할 수 있는 미생물 자체의 목적물질 생산능을 증대시키는 것이다. 미생물의 생산능을 증대시키기 위해 대사공학적, 시스템 생물학적, 유전공학적인 연구와 실험이 수행되고 있으며 이러한 기술은 이미 전세계적으로 상당한 수준에 도달해 있다. 두 번째는 미생물이 목표물질을 보다 많이 생산할 수 있는 환경을 조성해주는 것으로 배지 최적화, 공정적인 개선법 등이 사용된다. 그러나 현재까지 미생물 발효공정을 이용하여 목적물질의 산업적 대량생산의 효율적인 시스템을 구축한 예는 아직 없다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 기존의 유기화학적 공법을 대체하는 미생물 발효공법을 이용하면서도 높은 수율로 숙신산을 대량 생산할 수 있는 신규한 숙신산 생산방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 균주의 숙신산 생

산에 관여하는 조효소인 NAD, NADH, NADP 및 NADPH의 양을 정량함으로써 균주의 발효 효율을 최적상태로 만드는 배양조건이 갖추어졌는지를 간편하고 신속하게 확인할 수 있다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 숙신산 생산 균주의 배양 배지의 아미노산 조성 결정 방법을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 숙신산 생산 균주의 배양 배지의 질소원 함량 결정 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 숙신산 생산 균주의 배양 배지의 탄소원 조성 결정 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 숙신산 생산 균주 배양 배지의 아미노산 조성 결정 방법을 제공한다:

[0012] (a) 자연계의 20가지 아미노산 중 1가지 또는 2가지 이상의 아미노산을 포함하는 배지에서 숙신산 생산 균주를 배양하는 단계; 및

[0013] (b) 상기 배양 균주 내의 NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도를 정량하는 단계, NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도가 대조균 균주보다 증가하는 경우에는 상기 1가지 또는 2가지 이상의 아미노산의 조합은 상기 균주의 숙신산 생산 효율 증가를 위해 배양배지에 첨가되는 아미노산 또는 그 조합으로 판단한다.

[0014] 본 발명자들은 숙신산의 유기화학적 제법을 대체하는 미생물 발효공법을 통해 높은 수율로 대량생산할 수 있는 신규한 숙신산 생산방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 균주의 숙신산 생산에 관여하는 조효소인 NAD, NADH, NADP 및 NADPH의 양을 정량함으로써 균주의 발효 효율을 최적상태로 만드는 배양조건이 갖추어졌는지를 간편하고 신속하게 확인할 수 있으며, 이를 통해 다양한 숙신산 생산균주에 대한 배양배지의 최적 성분함량을 신속하게 결정할 수 있다는 사실을 발견하게 되었다.

[0015] 본 명세서에서 용어 “숙신산 생산 균주”는 스스로의 효소를 이용한 발효(fermentation) 과정을 통하여 최종 대사산물로서 숙신산을 생산하는 균주로서 아나어로비오스피릴럼 속시니키프로두켄스(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*), 액티노바실러스 속시노젠(*Actinobacillus succinogenes*) 및 맨하이미아 속시니키프로두켄스(*Mannheimia succiniciproducens*)와 같은 혐기성 박테리아(anaerobic bacteria)를 포함하나, 이에 제한되지 않고 대사산물로서 숙신산을 생산하는 균주로서 당업계에 알려진 모든 균주를 포함한다.

[0016] 본 발명에 이용 가능한 배지는 숙신산 생산 균주의 배양에 이용되는 어떠한 배지도 포함하나, 바람직하게는 MH3 배지, MRS(deMan Rogosa Sharpe) 브로스 배지, APT(All Purpose with Tween) 배지 또는 BHI(Brain Heart Infusion) 배지이며, 가장 바람직하게는 MH3 배지이다.

[0017] 본 발명에 따르면, 본 발명의 균주에 의한 숙신산 생산효율은 효소에 의한 촉매반응에 관여하는 조효소(coenzyme)의 양을 정량함으로써 이를 측정할 수 있다. 본 발명에서 용어 “조효소(coenzyme)”란 혐기성 대사과정에서 전자전달에 관여하는 NAD, NADH, NADP 또는 NADPH를 말한다. 이들 조효소의 양을 정량하는 방법은 당업계에서 상업적으로 이용 가능한 키트를 이용하며, 예를 들어 EnzyChrom™ NAD/NADH Assay Kit(에세이 완충액:10 mL, 에탄올(1 부피%):1.5 mL, PMS 용액:1.5 mL, MTT 용액:1.5 mL, 효소: 120 μL, NAD 표준액: 0.5 mL 1 mM, NAD/NADH 추출 완충액:각각 12 mL)를 이용할 수 있다. 본 발명에 따르면, 자연계의 아미노산 20가지 중 1가지 또는 2가지 이상의 아미노산을 배양액에 첨가시켜준 후 상술한 장치를 통해 상기 조효소의 양이 대조균 균주보다 증가됨을 확인한 경우, 활성이 촉진된 혐기성 대사과정에 의해 숙신산의 수율이 증가하였음을 확인할 수 있다. 따라서 본 발명은 숙신산 수율 분석을 위하여 숙신산을 회수 정제하거나, 정량적인 유효 데이터를 얻기 위하여 감압농축 하는 등의 복잡한 과정 없이 신속하게 수율 증가를 비교 분석하여 최적의 아미노산 또는 아미노산들의 조합을 결정할 수 있다.

- [0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 숙신산 생산 균주 배양 배지의 질소원 함량 결정 방법을 제공한다:
- [0019] (a) 증가된 질소원 함량을 가지는 배지에서 숙신산 생산 균주를 배양하는 단계; 및
- [0020] (b) 상기 배양 균주 내의 NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도를 정량하는 단계, NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도가 대조균 균주보다 증가하는 경우에는 상기 증가된 질소원의 최종 함량은 상기 균주의 숙신산 발효 생산 증가를 위해 배양배지에 포함되는 질소원의 함량으로 판단한다.
- [0021] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 조성비를 나타내기 위하여 사용되는 “함량”은 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “질소원(nitrogen source)”은 미생물의 생장에 있어서 단백질, 퓨린(purine), 피리미딘(pyrimidine) 및 다당류 키틴(chitin) 등의 합성에 필수적인 질소원자를 포함하는 유기 또는 무기물을 말한다. 무기태 질소원으로는 KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , NaNO_2 및 NH_4Cl 이 있으며, 유기태 질소원으로는 아스파라긴, 글루타민산, 우레아(Urea), 펩톤(Peptide) 등이 있다. 미생물은 암모늄염이나 질산염 등의 무기태 질소를 이용할 수 있으나, 미생물의 종류에 따라 아미노산이나 펩톤(peptide) 등의 유기태 질소를 요구하는 것도 있다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 질소원은 질산염, 아미노산, 효모추출물(yeast extract), 쏘이톤(soy tone), 펩톤(peptide), 트립톤(tryptone), 맥아추출물(malt extract), 황산암모늄(ammonium sulphate) 및 탈지분유(skim milk)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 질소원이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 질소원은 효모추출물(yeast extract) 또는 황산암모늄(ammonium sulphate)이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 숙신산 생산 균주 배양 배지의 탄소원 함량 결정 방법을 제공한다:
- [0025] (a) 증가된 탄소원 함량을 가지는 배지에서 숙신산 생산 균주를 배양하는 단계; 및
- [0026] (b) 상기 배양 균주 내의 NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도를 정량하는 단계, NAD, NADH, NADP 또는 NADPH의 농도가 대조균 균주보다 증가하는 경우에는 상기 증가된 탄소원의 최종 중량비는 상기 균주의 숙신산 생산 효율 증가를 위해 배양배지에 포함되는 탄소의 중량비로 판단한다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “탄소원(carbon source)”은 미생물의 생장에 있어서 세포구조와 에너지원으로 사용되는 탄소를 포함하는 고분자 또는 저분자 물질을 의미하며, 다당류(polysaccharides), 단당류(monosaccharides), 유기산(organic acid), 아미노산(amino acid), 알콜(alcohol), 다환식 함유물(polycyclic compounds), 세룰로오스(cellulose), 헤미셀룰로오스(hemicellulose), 리그닌(lignin) 등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 통상적으로 배양 배지에 첨가되는 탄소원의 농도는 1-5 % 정도이나, 실제 배양 미생물에 따른 구체적인 탄소원의 최적 농도는 알려져 있지 않다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 탄소원은 수크로스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 아라비노스, 말토스, 락토스, 사과산, 구연산 및 주석산으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 탄소원이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 탄소원은 글루코스이다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 숙신산 생산 균주는 맨하이미아 속(*Mannheimia* genus) 균주이다. 보다 바람직하게는 본 발명의 숙신산 생산 균주는 맨하이미아 속시니키프로두켄스(*Mannheimia succiniciproducens*) 또는 상기 박테리아와 동일한 RFLP DNA 프로파일을 갖는 그의 자손 박테리아이다.
- [0030] 본 발명의 맨하이미아 속 균주는 혐기성 그람-음성 균으로, 파스퇴렐라과(Pasteurellaceae family)의 막대형(rod-shaped) 박테리아이며, *M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. granulomatis*, *M. ruminalis* 및 *M. varigena* 등의 종(species)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 맨하이미아 속 균주인 맨하이미아 속시니키프로두켄스(*Mannheimia succiniciproducens*)는 한우의 반추위에서 분리 동정된 루멘 박테리아의 변이균주로서, CO_2 존재 하의 혐기성 상황 하에서 주요 발효 산물로서 숙신산을 대량으로 생산한다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0032] (a) 본 발명은 숙신산 발효 균주의 숙신산 생산 수율을 증가시키기 위한 배양배지의 구성 함량 결정방법을 제공한다.
- [0033] (b) 본 발명은 다양한 화합물의 핵심 전구체인 숙신산을 친환경적이면서도 효율적인 공정을 통하여 대량생산할 수 있는 새로운 미생물 발효공정에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0034] 본 발명은 다양한 화합물의 핵심 전구체인 숙신산을 친환경적이면서도 효율적인 공정을 통하여 대량생산할 수 있는 새로운 미생물 발효공정에 유용하게 이용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 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.

[0036] 실시예

- [0037] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.