



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2010-0109902  
 (43) 공개일자 2010년10월11일

(51) Int. Cl.

*C12N 1/20* (2006.01) *C12P 7/46* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2010-7013061
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2007년12월28일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2010년06월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2007/055409
- (87) 국제공개번호 WO 2009/083756  
 국제공개일자 2009년07월09일

(71) 출원인

**로제뜨프레르**  
 프랑스공화국레스트렘62136  
**윌리엄 마쉬 라이스 유니버시티**  
 미국 텍사스주 휴스턴 메인 스트리트 6100

(72) 발명자

**세구엘라, 로랑**  
 프랑스 에프-59350 생-앙드레 레즈 릴르 뒤 뒤 제  
 네랄 레클레르 46  
**샌, 카-위**  
 미국 77005 텍사스주 휴스턴 메인 스트리트 6100  
 윌리엄 마쉬 라이스 유니버시티 내  
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인

**양영준, 전경석, 김영**

전체 청구항 수 : 총 16 항

**(54) 대규모 미생물 배양 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 일반적으로 숙신산과 같은 대사 물질을 많은 양으로 생산하기 위한 신규의 배양 방법에 관한 것이다. 상기 배양 방법은, pH를 조절하지 않는 산소-풍부 배양을 이용하여 바이오매스를 증가시키고, < 5%의 산소분압을 가진 산소 희박 조건 하에 적응시키며, 산소 결핍 조건 하에서 많은 양의 숙신산염을 생산한다. 이러한 방법은 단일 반응기에서 수행될 수 있으며, 효율적인 규모 확대에 맞게 개량될 수 있다.

(72) 발명자

**베넷, 조지**

미국 77005 텍사스주 휴스턴 메인 스트리트 6100  
윌리엄 마쉬 라이스 유니버시티 내

**마르티네즈, 아이린**

미국 77005 텍사스주 휴스턴 메인 스트리트 6100  
윌리엄 마쉬 라이스 유니버시티 내

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

대사 물질을 생산하는 미생물을 단일 반응기에서 배양하는 방법으로,

- a) 대사 물질을 생산할 수 있는 미생물과 배양배지를 반응기에서 접종하는 단계와,
- b) 상기 배지의 pH를 조절하거나 하지 않아도 되되, 바람직하게는 상기 배지의 pH를 조절하여, 상기 미생물을, 상기 반응기 내, 산소가 풍부한 조건 하에 배양하는 단계와,
- c) 상기 미생물을, 상기 반응기 내, 5% 미만의 산소를 함유하는 산소 희박 조건에 적응시키는 단계와,
- d) CO<sub>2</sub> 또는 불활성 기체와 혼합된 CO<sub>2</sub>로 퍼징함으로써 상기 반응기 내부를 산소 결핍 조건으로 변경하는 단계와,
- e) 상기 대사 물질을 생산하기에 충분한 기간 동안 상기 미생물을 상기 산소 결핍 조건 하에 배양하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대사 물질은 숙신산, 말산(malic acid), 푸마르산(fumaric acid), 젖산, 글리세롤, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올로 구성된 군에서 선택되되, 바람직하게는 숙신산인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물은 *Escherichia* 또는 *Escherichia coli* 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 미생물은 동일한 가용량의 NADH에 대해 야생형 균주보다 더 많은 숙신산염을 생산하도록 유전자적으로 변형된 재조합 *Escherichia coli*인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 미생물은 비활성화된 *adhE*, *ldhA*, *ack-pta* 및/또는 *iclR* 유전자를 함유하며, 과잉발현된 *pyc* 유전자를 가진 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제4항에 있어서, 미생물은 유전자형  $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta ackpta$  PYC 또는  $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta ack$  PYC 또는  $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta pta$  PYC를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제4항에 있어서, 미생물은 SBS550MG-pHL413인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

제5항에 있어서, 배양배지는 무기질 배양배지인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 단계 c) 또는 단계 e) 동안에 적어도 1회 이상 추가의 탄소를 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 추가의 탄소는, 배양배지의 pH가 상기 적응 단계 동안에 약 7 미만의 값으로 저하되는 경우에 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 단계 d)는 배양배지의 pH가 약 7.2로 증가된 경우에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 단계 d)는 상기 배양배지가 2시간 이상 동안 산소 희박 조건 하에 놓여진 경우에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 단계 c)는, t=0에 배양배지에 도입된 탄소 공급원의 대부분이 상기 미생물에 의해 단계 b) 동안에 소비된 후에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 상기 적응 단계는, 상기 미생물이 600nm 에서의 흡광도가 15를 초과하는 경우에 시작되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 단계 a) 내지 단계 e)는 발효기 내에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 단계 e)가 끝난 후 배양배지에 존재하는 숙신산염 이온을 숙신산으로 전환시키기 위한 산화반응 단계 f)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 대규모 미생물 배양 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 혐기성 발효법과 호기성 호흡법은 화학물질의 산업생산에 대한 관심의 대상이 되는 두가지 대사 방식이다. 산소가 풍부한 호흡법은 매우 효율적인 세포 성장(성장속도 및 수율)을 제공하고, 탄소 공급원의 높은 비율을 이산화탄소 및 세포괴(cell mass)로 전환시킨다(표 1 참조). 한편, 혐기성 발효법은 세포 성장이 나쁘며, 몇몇 발효 생성물들(예컨대, 젖산염, 포름산염, 에탄올, 아세트산염, 숙신산염 등)을 고수율로 합성한다.

[0003] 표 1.

호흡식 대사 VS 발효식 대사

변수	혐기성 발효법	혐기성 호흡법	호기성 호흡법
성장속도	낮음	중간	높음
세포괴	낮음	중간	높음
생산수율	높음	높음/중간	낮음
자본 비용	낮음	낮음	높음
에너지 투입	낮음	낮음	높음

[0004]

[0005] 그러나, 풍부한 산소를 이용하는 공정을 통해 화학물질을 생산하는 일은 두가지 이유에서 혐기성 방법을 이용하는 것보다 비용이 더 든다. 첫째는, 장치(unit) 당 고비용 그리고 규모의 경제 축소와 함께 소규모 발효기에 대한 요구로 인해, 호기성 발효기를 제조하는 일이 비용이 더 많이 든다는 것이다. 둘째는, 산소의 낮은 용해도 (이는 결과적으로 세포에 산소의 적당한 공급을 보장하도록 높은 에너지 투입을 요구함)로 인해, 호기성 발효기는, 그들의 혐기성 발효기보다, 작동시키는 데에 비용이 더 든다. 이는 발효비용이 전체 생산비용의 50-90%를 나타내는 유용화학품(commodity chemicals)의 생산과 특히 관련이 있다.

[0006] 그러므로, 가능하다면 혐기성 방법이 대체로 바람직하며, 세포를 다수로 호기적으로 성장시키고 나서, 원하는 분자의 생성을 위해 혐기성 배양법으로 전환하는 것이 통상적이다. 하지만, 종종, 이 방법은 비성공적으로, 낮

은 수율과 낮은 속도를 초래한다.

- [0007] JL Stokes가 1949년에 "Fermentation of glucose by suspensions of *Escherichia coli*" (published in *J. Bacteriol.*, 57: 147-158) 제목의 논문에 기술한 바와 같이, *E. coli*의 발효를 시작으로, 숙신산을 포함한 여러 산류의 혼합물을 생성한다는 것이 오랜 시간 동안 공지되어 왔다. 그러나, 발효된 글루코스 1몰 당, Stokes 방법에 의해서는 단지 0.3 내지 0.4몰의 숙신산이 생산된다.
- [0008] 따라서, 수율을 향상시키기 위해, 세균(박테리아)을 유전적으로 변형시킴으로써, 숙신산의 생산에 필요한 NADH를 소비하는 대사 경로들을 비활성화하고, 숙신산염(숙신산의 염)을 생산하기 위한 대사 경로들은 활성화하였다. 실제로, 옥살로아세테이트를 말산염(malate), 다음으로는 푸마르산염(fumarate), 그리고 마지막으로 숙신산염으로 전환하게 하는 발효성 대사 경로는 생산되는 숙신산염 1몰 당 2몰의 NADH를 필요로 한다. 따라서 숙신산염의 생산에 대한 주요 대사 장애물은 NADH의 세포적 생체 이용률이다.
- [0009] 이 문제를 해결하기 위해, US7223567은 동일한 가용량의 NADH에 대해 숙신산염을 과잉 생산하는 재조합 *E. coli* 균주의 용도에 대해 기재하고 있다. 이러한 *E. coli* 균주 "SBS550MG-pHL413"은 *adhE*, *ldhA* 유전자들(NADH를 소비하는 경로와 연관됨)을 비활성화하고, *ack-pta* 유전자들과 *iclR* 유전자(이는 글리옥실산염 경로를 활성화시킴)를 비활성화 하였으며, 외인성 *pyc* 유전자를 과발현시키는 플라스미드 벡터를 갖고 있다.
- [0010] Sanchez et al. (제목: "Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity" in *Metabolic Engineering* 7 (2005) 229-239)의 논문, US7223567 및 US2005042736 각각은, 이러한 균주의 숙신산 생산수율을 향상시키도록, 이 균주와 관련된 신규의 배양 및 생산 조건들을 개발하였다. 이들 특허는 그 전체가 본원에 참조로써 통합되었다.
- [0011] Sanchez et al, US7223567 및 US2005042736에 의하면, SBS550MG-pHL413을 먼저 호기성 조건 하에 삼각 플라스크(Erlenmeyer flask)에서 LB 배양배지 내에 배양하여 최대량의 바이오매스가 생산되도록 하고, 원심분리법에 의해 바이오매스를 농축한 후, 숙신산을 생산하기 위해 풍부한 배양배지를 가진 바이오반응기 내로 혐기성 조건 하에 이송하였다. 이들 실험에 의하면 글루코스 1몰 당 숙신산염의 몰 수율이 US2005042736에서는 1.2 또는 1.3 만큼 높되 일반적으로 1.5 미만이었던 반면에, US7223567에서는 1.7 만큼 높았다.
- [0012] 그러나, 이들 실험의 배양 조건들은 실험실 규모로 개발된 것으로, 산업 규모로 바꾸기에는 어려울 수 있는데, 그 이유는 삼각 플라스크 내에서의 첫째 배양 단계와 농축된 바이오매스를 회수하기 위한 원심분리법이 규모가 큰 부피를 다루기에 쉽게 적응되지 않기 때문이다. 더 나아가, 숙신산의 수율 및 이러한 균주의 성장속도를 훨씬 더 증가시키고, 숙신산염의 고수율을 대규모로 더욱 재현가능하게 하는 것이 바람직할 것이다.
- [0013] 당해 기술분야에 필요한 것은, 숙신산염과 같은 화합물이 높은 수율과 빠른 속도로 생산되도록 하는 한편, 규모 확대에 맞게 개량가능하고 비용효율적인, 신규의 배양 방법이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0014] 본 발명은 많은 양의 대사생성물(예컨대, 숙신산염, 푸마르산염, 말산염, 젖산염, 에탄올, 글리세롤, 프로판올, 부탄올 및 기타 유사한 것, 바람직하게는 숙신산염)을 생산하기 위한 신규의 미생물 배양 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물의 제조 방법에 관한 것이다. 본원에서는 본 발명이 숙신산염으로 예시되어 있지만, 미생물 배양에 폭넓게 적용되어 다양한 최종 제품을 만들 수 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0015] 본 발명가들은 호기성 조건에서 혐기성 조건으로 바로 전환되면 글루코스 1몰 당 숙신산염이 매우 낮은 몰 수율-대략 0.4 내지 0.8의 몰 수율-로 생산된다는 것을 발견하였다. 그러나, 비록 적기는 하나 약간의 산소를 가진 산소 희박 단계를 거침으로써 보다 서서히 혐기성 조건으로 전환되는 경우에, 세포는 놀랍게도 훨씬 높은 몰 수율(한 검사에서 1.68)을 제공하고, 숙신산염을 더 높은 비속도(specific rate)(한 검사에서 0.116 g/l/hr/OD)로 생산한다. 따라서, 신규의 배양 방법론은 몰 수율을 1.5보다 높게, 바람직하게는 1.6까지, 심지어는 1.7 만큼 높게 향상시키며, 훨씬 더욱 중요하게는 생산율을 증가시킨다. 또한, 시스템이 더 최적화된다면, 글루코스 1몰 당 숙신산염이 1.8, 1.9 또는 2몰까지 추가적인 증가도 가능하다. 따라서, 본 방법은 종래 기술의 방법론보다 훨씬 더 효율적이며 재현가능하고, 상당한 규모 확대에 맞게 개량가능하다.

[0016] 많은 실험을 한 후, 동일한 바이오반응기에서 세포성장 및 숙신산염 생산 양측 모두에 높은 수율과 높은 속도가 가능한 신규의 배양 방법을 개발하였다. 이에 관련된 단계들로는: 1) 산소가 풍부한 조건 하에 pH 조절 없이 성장하는 단계; 2) 산소가 희박한 조건 하에서 적응(acclimation)하는 단계(이는 통상 0.5 시간 이상 걸리며, 여러 시간이 걸릴 수도 있음); 및 3) 산소 결핍 조건 및 이산화탄소가 풍부한 환경 하에서 생산하는 단계가 있다. 이들 단계 동안 필요하다면 탄소가 추가로 제공될 수 있다.

[0017] 산소공급이 항상 충분했던 하기 실험에 의해 적응 단계의 중요성을 증명할 수 있다. 이 실험에서, 세포를 800 RPM의 높은 교반 속도 하에 성장시키고, 반응기 내부에 이산화탄소를 분사함으로써 혐기성 단계로 바로 전환하였다. 이 경우 용존산소는 대부분 60%를 초과하였다(데이터 미제공). 적응 없이는, 본 방법을 수행하기가 어려웠다. 물 수율은 예상치인 ~1.6 보다 낮았고, 비속도는 0.06 g/L/h/OD 보다 낮았다.

배치 번호	산소가 풍부한 단계에서의 초기 교반(RPM)	산소가 풍부한 단계에서의 최종 교반(RPM)	공기 유량 (L/min)	기체 (Base)	물 수율	비속도 (g/L/h/OD)
30	800	800	2.5	NaCO <sub>3</sub>	~1.4	0.06 <

[0018] 더 낮은 교반 속도(따라서 더 적은 산소)를 이용한 또 다른 검사의 결과를 하기에 나타내었다. 이 경우 용존산소는 매우 낮았지만(<5%), 물 수율과 비생산 속도(specific production rate)는 훨씬 더 높았다. 물 수율은 최대 이론적 수율인 1.6에 가까웠고 비생산 속도는 0.1 g/L/h/OD를 초과하였다.

배치 번호	산소가 풍부한 단계에서의 초기 교반(RPM)	산소가 풍부한 단계에서의 최종 교반(RPM)	공기 유량 (L/min)	기체 (Base)	물 수율	비속도 (g/L/h/OD)
31	500	500	1.5	NaCO <sub>3</sub>	~1.6	> 0.10

[0020] "산소가 풍부한 조건"이 의미하는 것은 일반적으로 공기 형태로 산소가 존재함(예컨대, 호기성)을 특징으로 하는 배양 조건이다. 바람직하게 발효 배지의 산소 분압은 t=0 에서 60-100%, 또는 80-90% 이다. 적절한 산소투여(oxygenation)를 보장하는 기타 수단, 예컨대 기포 발생 및 산소가 풍부한 헤드 가스를 사용할 수도 있지만, 산소가 풍부한 조건 하의 미생물 배양을 위해서는 배지를 교반하는 것이 권장된다.

[0022] "산소가 희박한 조건"이 의미하는 것은 공급된 산소가 미생물에 의해 완전히 소비되지만, 시스템에서 산소가 퍼진 것은 **아니므로** 배양배지 내 산소 분압(pO<sub>2</sub>)이 < 5%, 바람직하게는 < 2%, 바람직하게는 0-1%인 배양 조건이다. 적응 조건이나 산소가 희박한 조건은 다수의 방법에 의해 달성될 수 있다. 이들 방법은 교반(agitation or stirring) 속도의 변경(예컨대, 4-500 rpm으로 감속), 가스 유량 또는 불활성 기체 조성의 변경, 또는 세포 농도 증가(그리하여 산소 요구량이 높아짐)를 위한 더 많은 글루코스의 첨가, 또는 이들의 조합이 있다.

[0023] 바람직하게는, 산소가 풍부한 조건 하에 충분한 세포피가 축적되자마자, 예를 들어 600nm에서 약 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 또는 그 이상의 흡광도가 얻어질 때 까지(즉, 건조된 미생물의 4 g/l 이상이 될 때 까지) 세포피가 축적되면, 적응단계가 시작된다. 또한 바람직하게는, t=0 에서 배양배지 내로 도입된 탄소 공급원의 대부분 또는 전부가 소비된 후에 저산소 적응 단계가 수행된다.

[0024] 세포가 저산소 조건에 충분히 적응되면 배양체를 산소 결핍 조건으로 전환하며, 본원에 기재된 바와 같이 최적점을 시험하는 것이 가능해진다. 본원에 사용된 이러한 세포, 배양배지 및 배양 방법들 덕분에, 적응을 위해 약 2시간이 충분하였고, pH 증가는 이들 조건 하에서 적응하였음을 표시하는 것이다.

[0025] "산소 결핍 조건"이 의미하는 것은 상당한 양의 산소가 없는, 예컨대 혐기성 배양 조건이다. 당해 기술 분야의 숙련자라면 어떻게 산소 결핍 배양 조건으로 변경하는지 알 것이다. 따라서, 표준 방식에서 산소를, 예를 들어, 보통 이산화탄소 기체나 탄산염, 또는 기타 불활성 기체와 혼합된 이산화탄소의 형태로 있는 이산화탄소로 대체함으로써 변경시키는 것이 가능하다.

[0026] 바람직하게, 산소 결핍 조건은 보통 이산화탄소 또는 탄산염의 형태로 존재하는 CO<sub>2</sub>의 영구 주입으로 특징지어지는 발효공정에서 달성된다. 본 발명에 따르면, 예를 들어, CO<sub>2</sub>를 0.1 내지 0.5 vvm, 바람직하게는 0.3 vvm(CO<sub>2</sub>의 부피/배양배지 부피/분)의 속도로 바이오반응기 내부에 주입한다.

[0027] "배양배지"가 의미하는 것은 상기 미생물의 성장에 필요한 화학적 요소들은 물론, 바람직하게는 유기성의, 탄소 공급원 1종 이상 및 질소 공급원 1종을 함유하는 배지이다.

[0028] 배양배지는 일반적으로 하기를 함유한다:

칼륨 및 인의 공급원(예를 들어, $K_2HPO_4$ )
황의 공급원(예를 들어, $(NH_4)_2SO_4$ )
마그네슘의 공급원(예를 들어, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
칼슘의 공급원(예를 들어, $CaCl_2$ )
철의 공급원(예를 들어, 황산철)
미량원소들의 공급원(예를 들어, Cu, Zn, Co, Ni, B, Ti 염류)
물
필요한 경우, pH 버퍼
바람직하게는 유기성의 탄소 공급원 1종 이상(효모 추출물, 글루코스, 글리세롤, 전분, 옥수수 부산물 등)
질소 공급원 1종 이상(효소 추출물, 옥수수 침출물(corn steep) 등)

[0029]

[0030] 선택적으로 본 발명에 따른 배양배지는 또한 항생제(예를 들어, 암피실린, 카베니실린 또는 옥사실린 등)를 함유할 수 있으며, 이러한 경우는 미생물이 상기 항생제에 내성인 유전자를 예를 들어 플라스미드와 같은 벡터 상에, 또는 유기체(organism)의 DNA 내에 통합된 상태로 가지고 있을 때이다.

[0031] 글루코스 또는 전분 가수분해물은 탄소 공급원의 예로서 언급하였다. 본 발명에 따르면, 탄소 공급원은 바람직하게 글루코사이되, 미생물이 이용할 수 있는 어떠한 탄소 공급원이라도 사용가능하다. 예를 들어, 글리세롤, 텍스트로스, 옥수수 부산물 및 곡류 또는 풀 또는 이들의 부산물 모두가 탄소의 공급원을 제공하기 위해 사용될 수 있다.

[0032] 탄소 공급원을 함유한 배양배지 조성의 일례를 하기에 제공하였다:

글루코스	2g
트립톤	20g
효소 추출물	10g
$(NH_4)HPO_4$	3g
$KH_2PO_4$	1.2g
$K_2HPO_4$	0.7g
$MgSO_4$	0.25g
$CaCl_2$	0.2g
티아민	0.99mg
비오틴	1mg
물	부피를 1000mL로 만들

[0033]

[0034] 바람직하게, 배양배지는 무기질 배양배지이다. "무기질 배양배지"가 의미하는 것은 단백질을 함유하지 않은 배지로, 즉 질소가 무기질 경로에 의해 제공되며, 본질적으로 용액 중의 무기질은 물론 탄소 공급원(바람직하게는, 글루코스)으로 이루어진 배지이다.

[0035] 무기질 배양배지의 조성의 일례를 하기에 제공하였다:

글루코스	10g
(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>	6g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1g
KCl	2g
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1mg
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	60mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.4mg
비오틴	1mg
티아민	1mg
증류수	부피를 1000mL로 만들

[0036]

[0037] "숙신산을 생산할 수 있는 미생물"이 의미하는 것은, 자연적 대사작용에 의해서 또는 유전자 조작의 결과로 숙신산을 생산할 수 있는 임의의 미생물이다.

[0038] 바람직하게, 이러한 미생물은 *Escherichia* 또는 *E. coli* 종에 속한다. 본 발명에 따라 특히 바람직하게, *E. coli* 세균의 균주는, 천연 균주보다 더 많은 숙신산을 생산하도록 유전적으로 변형된 재조합 균주이다.

[0039] 또한, 더욱 특히 바람직한 것은 유전자형  $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta ackpta$  PYC 또는  $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta ack$  PYC 또는  $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta pta$  PYC를 가진 균주이다. 이러한 유전자형은 CO<sub>2</sub>의 존재 하에 발효에 의한 숙신산 생산을 촉진시킨다. 부호  $\Delta$ 는 대상이 되는 유전자가 예를 들어 변이, 삭제, 중단, 삽입, 또는 (예컨대, 종결 코돈을 도입, 삽입 또는 삭제하여 해독됨, 접변이 등을 변화시킴으로써 수행되는) "하향"-조절을 통해 비활성화되었음을 가리킨다.

[0040] 따라서 유전자형  $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta iclR \Delta ackpta$  PYC는 이하에 해당된다:

$\Delta adhE$	알콜탈수소효소의 비활성화
$\Delta ldhA$	젖산탈수소효소의 비활성화
$\Delta iclR$	이소시트르산탈수소효소(aceA의 이름으로도 공지됨)의 비활성화
$\Delta ackpta$	아세트산 인산화효소(acetate kinase) 및 포스포트랜스아세틸라아제(phosphotransacetylase)의 비활성화. 아세트산 인산화효소 또는 포스포트랜스아세틸라아제 중 하나가 비활성화된 균주( $\Delta ack$ 또는 $\Delta pta$ )로 대체가능하다
PYC	Pyruvate carboxylase 유전자의 발현. 이는 균주가 이러한 유전자의 기능성 복제본을 포함하는 플라스미드에 의하거나, 또는 PYC의 기능성 복제본의 유전자 삽입(genomic integration)에 의한 형질변환을 통해 PYC 유전자를 발현시키는 것을 가리킨다. 유리하게 PYC 유전자는 <i>Lactococcus lactis</i> 의 PYC 유전자이다.

[0041]

[0042] 매우 바람직한 구현예에 따르면, *E. coli*의 균주는 SBS550MG-pHL413 균주이다. 이 균주에 대해 Sanchez et al의, *Metabolic Engineering*, 7 (2005) 229-239, 및 US7223567과 US20050042736에 기재되어 있다. 기타 균주로는 SBS330MG, SBS440MG, SBS550MG, SBS660MG 및 SBS990MG이 포함된다.

[0043] 본 발명의 신규 방법에 유리하게 사용될 수 있는 기타 숙신산염-생산 균주는 다음과 같다:

균주	유전자형
SBS110MG	<i>adhE ldhA</i> , Km <sup>S</sup>
SBS330MG	<i>adhE ldhA iclR</i> , Km <sup>S</sup>
SBS440MG	<i>adhE, ldhA, iclR, arcA</i> , Km <sup>S</sup>
SBS550MG	<i>adhE ldhA iclR, Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>
SBS550-P	<i>adhE ldhA iclR, poxB, Δ ackpta</i>
SBS550MG/ptsG	<i>adhE ldhA iclR, ptsG, Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>
SBS660MG	<i>adhE, ldhA, iclR, arcA, Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>
SBS990MG	<i>adhE ldhA Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>
SBS551MG	<i>adhE ldhA iclR, sdhAB Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>
SBS552MG	<i>adhE ldhA iclR, poxB, sdhAB Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>
SBS552MG/ptsG	<i>adhE ldhA iclR, ptsG, poxB, sdhAB Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>
PRP01	<i>adhE ldhA iclR Δ ackpta::Cm<sup>R</sup>, GalP<sup>+</sup></i> , Km <sup>S</sup>
PRP02	<i>adhE ldhA iclR, ptsHI, Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>
SBS1010MGC	<i>adhE ldhA fdhN Δ ackpta::Cm<sup>R</sup></i> , Km <sup>S</sup>

[0044]

[0045]

본원에 기술된 카복실산은 구조, pH, 존재하는 이온들 및 에스테르화되었는 지에 따라 결정되는 염, 산, 염기 또는 유도체일 수 있다. 예를 들어, 본원에서 "숙신산염" 과 "숙신산"은 상호교환적으로 사용되었다. 본원에 사용된 화합물질에는 포름산(염), 글라이옥실산(염), 젖산(염), 말산(염), 옥살로아세트산(염)(OAA), 포스포엔올 피르브산(염)(PEP) 및 피르브산(염)이 포함된다. 크렘스 사이클(Krebs cycle)(구연산, 트리카복실산 또는 TCA 사이클로도 불림)을 포함하는 세균성 대사 경로는 Lehninger의 Principles of Biochemistry 뿐만 아니라 기타 생화학 교재에서도 알아볼 수 있다.

[0046]

본원에서 "감소된 활성도"는, 적당한 대조용 종 (control species)과 비교했을 때 단백질 활성도가 75% 이상 감소된 상태로 정의된다. 바람직하게는, 80, 85, 90, 95% 이상의 활성도 감소가 달성되며, 가장 바람직한 구현에서는 활성도가 제거되거나 "비활성화"(100%)된다. 변이, 또는 발현이나 번역(translation)에 의한 억제, 및 이와 유사한 작용을 통해서 저해제(inhibitor)를 이용하여 단백질을 비활성화시킬 수 있다.

[0047]

본원에서 "과잉발현" 또는 "과잉발현된"은, 적당한 대조용 종과 비교했을 때 단백질 활성도가 150% 이상인 상태로 정의된다. 과잉발현은, 단백질에 변이를 일으켜 더 활성적인 형태 또는 저해작용에 내성인 형태를 생성하거나, 또는 저해제를 제거하거나, 또는 활성화제를 첨가하거나, 기타 유사한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 과잉 발현은 또한 억제제(repressor)를 제거하거나, 또는 유전자의 다수 복제본을 세포에 첨가하거나, 또는 내재 유전자를 상향조절하거나, 기타 유사한 방법에 의해 이루어질 수 있다.

[0048]

"배양"이 의미하는 것은, 원하는 목표가 이루어질 때까지 임의의 기간 동안, 예를 들어 0.5 내지 72 시간, 5 내지 48 시간, 훨씬 더욱 바람직하게는 8 내지 24 시간 동안 상기 미생물을 배양시킨다는 것이다. 바람직하게 적용 단계는 2시간 이상 걸리지만, 0.5 내지 5 시간 또는 1 내지 2 시간 중 어느 것이라도 된다.

[0049]

최적의 배양 온도는 20-40°C, 바람직하게는 약 36-39°C이고, 훨씬 더욱 바람직하게는 37°C이다. 다양한 미생물은 다양한 최적 온도 조건을 가질 수 있으며, 미생물을 위한 최적의 온도를 평가하는 방법은 잘 공지되어 있다.

[0050]

바람직하게, 본 발명에 따른 방법은 적어도 하나 이상의 추가적 단계- 적용 및/또는 생산 단계 동안에 탄소 공급원을 이차(또는 그 이상) 첨가하는 단계-를 포함한다. 바람직하게 공급원 및 첨가량은 최초 투여량과 동일하며, 바람직하게는 글루코스 2 내지 10 g/L이다. 그러나, 이들 공급원 및 첨가량은 상이하여도 된다.

[0051]

바람직하게 배양배지의 pH는 상기 미생물로 접종되기 전에 약 7 내지 약 8 이고, 유리하게는 약 7.5이며, pH가 약 7 미만의 값으로 저하되면 탄소를 추가로 투여한다. 그 후에, 산소 결핍 조건으로 전환하기 전에 pH는 약 7 보다 높은 값으로, 유리하게는 약 7.2 보다 높은 값으로 증가하게 된다.

[0052]

pH가 약 7 보다 낮은 값으로 저하되는 것이 관찰된다는 것은 유기산이 생산되는 현상과 연관될 수 있으며, 그러면 이들 유기산의 일부가 소비됨에 따라 pH가 다시 약 7 보다 높은 값으로 증가하고, 이로써 세포들이 성공적으로 적응하였음을 나타낸다.

[0053]

"pH 조절"이 의미하는 것은 주어진 주기(interval)에 걸쳐 배양배지의 pH값을 유지시키는 작업이다. 본 발명에 따르면, 다양한 방법으로 pH를 조절할 수 있다. 1) 주기에 걸쳐 조절하는 방법: pH값이 임의 범위의 값에 걸쳐 유지된다. 그런 후 pH값이 시간이 지남에 따라 변경될 수 있되, 고려된 범위를 벗어나지는 않는다. 2) "저점(low point)" 조절법: pH값이 임계값을 초과하는 값에 유지된다. 그런 후 pH값이 시간이 지남에 따라 변경될 수

있되, 임계값 미만으로 저하되지는 않는다. 3) 단일값으로 조절하는 방법: 시간이 지나도 pH값은 항상 이 값에 유지된다. 유리하게, pH를 조절해야 한다면, NaOH 또는 NH<sub>4</sub>OH의 첨가에 의해 이루어지는 것이 바람직하다.

[0054] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 방법은, 숙신산으로의 전환을 위해, 배양배지에 존재하는 숙신산염 이온을 생산 단계가 끝나면 산성화시키는 단계를 포함한다.

[0055] 본 발명의 또 다른 양상은 숙신산을 수득하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 숙신산을 제조하는 공정, 숙신산을 정제하는 단계 및 선택적으로, 숙신산을 결정화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 유리하게, 정제 단계는 양극성(bipolar) 전기투석법으로 이루어지고, 결정화 단계는 증발식 결정화에 의해 수행되고/되거나 물에 냉각시켜 결정화함으로써 수행된다.

**도면의 간단한 설명**

[0056] 도 1은, 산소가 풍부한 단계와 산소가 결핍된 단계 동안, 산소 분압(pO<sub>2</sub>)(왼쪽 눈금) 및 실시예 2의 조건에 따른 pH(오른쪽 눈금)의 변화추이를 각각 나타내는 그래프.

도 2는 실시예 3의 조건에 따라 산소가 풍부한 단계에서의 교반이 바이오매스의 생산 성능(CO<sub>2</sub> 하에 18 시간 동안 배양시킨 후 측정됨)에 미치는 영향을 나타내는 도면.

도 3은 산소가 풍부한 단계와 산소가 결핍된 단계 동안, 산소 분압(pO<sub>2</sub>), pH 및 실시예 4의 조건에 따라 배양배지에 첨가된 NaOH의 양의 변화추이를 각각 나타내는 그래프.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0057] 하기의 실시예들은 본 발명에 따른 방법의 바람직한 구현예들에 기술하되, 이로써 본 발명의 범위를 한정하려는 것은 아니다.

**[0058] 실시예 1: pH 조절**

[0059] 산소가 풍부한 세포 성장 동안의 pH 조절이 미치는 해로운 영향을 하기의 자료에 나타내었다. 500 RPM의 낮은 교반 속도에서 염의 추가에 상관없이 pH를 7.0로 조절하면, 숙신산염의 물 수율은 언제나 기대치인 ~1.6 보다 낮다.

	실험예 1	실험예 2
산소가 풍부한 배지	LB	LB + 염 추가
	글루코스 2 g/L	글루코스 2 g/L
	30 microl/L antifoam 204	30 microl/L antifoam 204
	200 mg/L Ap	200 mg/L Ap
조건	37°C	37°C
	500 rpm	500 rpm
	공기 1.5 L/min	공기 1.5 L/min
	pH=7.0	pH=7.0
숙신산염의 물 수율	1.2 ≤	1.2 ≤

[0060]

**실시예 2: 숙신산 생산**

[0061]

[0062] 본 실시예는 충분한 접종체를 생산하기 위한 삼각 플라스크에서의 전배양(pre-culture) 단계로서, 풍부한 배지에서(즉, 단백질과, 미생물에 의해 흡수될 수 있는 질소 공급원으로서의 펩타이드를 함유하고 있음) 산소가 풍부한 조건 하에 배양시키는 단계를 포함한다. 이 단계에 의해 바이오매스가 생산되고, 후속으로는 산소 희박 적응 단계 및 산소가 결핍된 생산 단계가 이어지면서 숙신산염의 실제 생산이 이루어진다. 이들 산소가 풍부한 단계, 산소가 희박한 단계 및 산소가 결핍된 단계 모두는 동일한 발효기에서 수행되며, 본원에서는 예시용으로 SBS550MG-pHL413 균주를 사용하였다.

[0063] 본 방법은 특히 산소가 풍부한 단계가 끝나고 원심분리에 의해 바이오매스를 농축하지 않는다는 점과 산소 희박 단계가 포함된다는 점에서 선행 기술과 구분된다.

[0064] 전배양 단계: SBS550MG-pHL413을 삼각 플라스크에서 125 rpm의 교반 하에 37°C에서 17 시간 동안 전배양시켰다.

2개의 배플이 구비된 2-리터 삼각 플라스크에서 배지 400ml을 균주와 접종시켰다. 이러한 전배양 배지의 조성은 다음과 같다:

- [0065] 트립톤 10 g/L
- [0066] 효모 추출물 5 g/L
- [0067] NaCl 10 g/L
- [0068] 항생제(암피실린, 카바니실린 또는 옥사실린) 67 mg/L
- [0069] **산소가 풍부한 단계 및 산소가 희박한 단계:** 이렇게 전배양된 균주를 다음과 같은 조성을 지닌 배양배지 내 4-리터 발효기에 배치하였다:
- [0070] 글루코스 T=0 일때 2 g/l, pH가 다시 증가하면 2 g/l 추가
- [0071] 트립톤 20 g/L
- [0072] 효모 추출물 10 g/L
- [0073] K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7 g/L
- [0074] KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 g/L
- [0075] (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/L
- [0076] MgSO<sub>4</sub> 0.25 g/L
- [0077] CaCl<sub>2</sub> 0.2 g/L
- [0078] 티아민 1 mg/L
- [0079] 비오틴 1 mg/L
- [0080] 암피실린 67 mg/L
- [0081] 삼각 플라스크 내에서 전배양에 의해 얻은 접종균액은 발효기에서 배지배양된 총 부피의 3%를 차지한다. 산소가 풍부한 단계 동안의 배양 조건은, 온도 37°C, 교반 속도 500 rpm, 2.5 vvm의 공기를 이용한 포기(aeration), 및 pH를 조절하지 않는 것이다(배지를 멸균처리 하기 전에 pH를 7.5에 간단히 조절하였음).
- [0082] 도 1에는 산소 분압(pO<sub>2</sub>)(왼쪽 눈금) 및 pH(오른쪽 눈금)를 나타내는 그래프가 도시되어 있다. 8 시간이 지나고 관찰된 첫 번째 pH 피크 7.2에서, 글루코스 2 g/l를 첨가하였다(배양배지의 조성에서 "pH가 다시 증가하면 2 g/l 추가"로 표시됨). 글루코스를 첨가한 후, pH가 7 미만으로 저하되는 것이 관찰되었으며, 9.5 시간이 지난 후 두 번째 pH 피크 7.4가 관찰되었다.
- [0083] 미생물을 성장시킨 결과로서, 7 1/2 시간이 지나면서부터는 산소 분압(pO<sub>2</sub>)이 < 1%(산소가 희박한 조건)로 낮아져서 그 상태로 2 시간 유지된다는 것을 주목한다. 이는, 배양이 종료된 후, 2 시간 동안에, 배양배지에 공급되었던 산소가 미생물에 의해 거의 완전히 소비되었음을 반영한다. 이러한 성장 단계를 본원에서는 "산소가 희박한 단계"라고 부른다.
- [0084] **산소가 결핍된 단계:** 이어서, 산소를 공급하는 대신 0.3 vvm의 CO<sub>2</sub>를 주입되고, 37°C, 250 rpm으로 교반이 수행되는 산소 결핍 조건 하에 균주를 배치되었다. 5M NaOH 용액을 이용하여 배양배지의 pH를 7로 조절하였다.
- [0085] 하기의 화합물들을 배양배지에 첨가하였다:
- [0086] 글루코스 20 g/L
- [0087] IPTG(유도물질)(필요한 경우) 0.238 g/L

[0088] 최종 결과는 다음과 같다:

지속시간 (hours)	600nm에서의 흡광도 (OD)	글루코스 (g/L)	숙신산 (g/L)
<b>산소가 풍부한 단계</b>			
7.7	11.5	0.0	0.0
<b>산소가 희박한 단계</b>			
9.5	16.7	0.0	0.0
<b>산소가 결핍된 단계: t=9.5h(CO<sub>2</sub> 하)</b>			
23.5	14	6	12.2
29.5	14	3.1	15.4
<b>T=29.5h: 15 g/L로 글루코스 첨가</b>			
48	12	11.6	21
72	10.6	4.3	27.1

[0089]

[0090] 그러므로 본 발명에 따른 방법을 구현하면, 최종 단계에서 상당량의 숙신산이 생산된다는 것이 관찰되었다.

[0091] **실시예 3: 성장 시 산소의 효과**

[0092] 본 실시예에는, 교반 속도에 변화를 주면서 산소의 효과를 연구하는 것이 목적이다. 성장 없이 CO<sub>2</sub> 하에, SBS550MG-pHL413 균주로 숙신산을 생산하였다. 성장 단계는, 실시예 2의 "산소가 풍부한 단계" 프로토콜에 따라 산소가 풍부한 조건 하에서 미리 수행하였으며, CO<sub>2</sub> 하에 18 시간 동안 수행된 교반 작업의 효과를 도 2에 도시하였다.

[0093] 성능 상에서 이러한 매개변수의 매우 현저한 효과가 관찰되었다. 생산성 및 수율에 대한 최적조건은 400-500rpm 이었으며, 600 rpm에서는 이 둘 모두가 현저히 저하되었다.

[0094] 따라서 산소의 전달은, 숙신산의 생산에 관련된 대사 경로의 유도를 위한 중요한 변수를 구성한다. 하나의 가설에 의하면, 이러한 유도 작업에 있어서, 세포들을 저산소 단계에 적응시키도록 산소가 풍부한 단계가 끝나면 용존산소량(pO<sub>2</sub>)이 거의 없거나 아예 없는 단계 - 바꾸어 말하면, 매우 적은 산소를 가진 산소 희박 단계가 시스템이 산소 결핍 단계 하에서 산소로 퍼징되기 이전에 필요하다는 것이다.

[0095] **실시예 4: pH 조절의 효과**

[0096] 본 실시예에는 전배양 단계, 산소가 풍부한 조건 하에 (무기질 배지와 대비되는) 풍부한 배양배지에서의 배양 단계, 산소 희박 단계, 및 발효에 의해 숙신산이 실제로 생산되는 산소 결핍 단계를 포함한다. 이들 단계는 모두 동일한 발효기에서 수행되며, 예시용으로 SBS550MG-pHL413 균주를 사용하였다.

[0097] 본 실시예에는, 산소가 풍부한 단계 및 산소가 결핍된 단계 동안에 pH를 저점인 6.75로 조절하였다는 점에서 이전의 실시예들과 주로 다르다.

[0098] **전배양 단계:** 실시예 2를 참조한다.

[0099] **산소가 풍부한 단계 및 산소가 희박한 단계:** 이렇게 전배양된 균주를 실시예 2의 배양배지 내 15L 발효기에 배치하였다. 삼각 플라스크 내에서 전배양에 의해 얻은 접종균액은 발효기에서 배지배양된 총 부피의 3%를 차지한다. 산소가 풍부한 단계 동안의 배양 조건으로는, 온도 37°C, 교반 속도 400 rpm, 1 vvm의 공기를 이용한 포기(aeration), 및 5N NaOH 용액을 이용하여 저점인 6.75로 조절된 pH가 포함된다. 산소 분압은 2시간 동안 < 1% (산소가 희박한 단계) 이었다.

[0100] 도 3에는 산소 분압(pO<sub>2</sub>)(왼쪽 눈금), pH(오른쪽 눈금) 및 pH 균형을 위해 사용된 NaOH의 변화추이를 각각 나타내는 그래프가 도시되어 있다. 7 시간이 지나고 관찰된 첫 번째 pH 피크 7.2에서, 글루코스 2 g/l를 첨가하였다 (배양배지의 조성에서 "pH가 다시 증가하면 2 g/l 추가"로 표시됨). 글루코스를 첨가한 후, pH가 7 미만으로 저하되는 것이 관찰되었으며, 8 시간이 지난 후 두 번째 pH 피크 7.6이 관찰되었다. 동시에, 7 시간이 지나면서부터는 산소 분압(pO<sub>2</sub>)이 < 2%(산소가 희박한 조건)로 낮아졌다. 8 시간의 배양 이후, 배양(조건)은 산소 결핍 단계로 변경되었다.

[0101] **산소가 결핍된 단계:** 이어서, 산소를 공급하는 대신 0.2 vvm의 CO<sub>2</sub>를 주입하고, 37°C, 250 rpm으로 교반이 수행

되는 산소 결핍 조건 하에 균주를 배치하였다. 5N NaOH 용액을 이용하여 배양배지의 pH를 저점인 6.75로 조절하였다. 산소 결핍 조건 하에 글루코스를 20 g/L로 배양배지에 첨가하였다.

[0102] 최종 결과는 다음과 같다:

지속시간 (hours)	600nm에서의 흡광도 (OD)	글루코스 (g/L)	숙신산 (g/L)
산소가 풍부한 단계			
7	8.5	0.0	0.0
산소가 희박한 단계			
8	15.4	0.0	0.0
산소가 결핍된 단계(CO <sub>2</sub> 하)			
26	10	0	20

[0103]

[0104] **실시예 5: 무기질 배지**

[0105] 아래의 표에는 본 작업에 의해 개발된 두 배지가 나타나 있다. MIN-N 배지는 수산화암모늄과 함께 pH 조절에 사용되는 것으로 한정된다.

	MIN	MIN-N
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	2.8
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0	1.0
KCl	2.0	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0	0.4
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0	2.0
pH 조절	NaOH	NH <sub>3</sub>

[0106]

[0107] 글루코스가 20 g/l로 보충되는, 상기 배지 덕분에 CO<sub>2</sub> 하 산소가 결핍된 단계에서 18 시간에 걸쳐 유의한(> 15 g/l) 숙신 생산을 수행하도록 충분한 바이오매스(흡광도 600 nm > 15)를 얻을 수 있다.

[0108] **실시예 6: pH를 조절한 무기질 배지**

[0109] 숙신산을 수득하기 위한 또 다른 방법은 전술된 무기질 배지의 용도를 포함하며, 전배양 단계, 발효기 내에서의 계대배양 단계, 산소가 풍부한 조건 하에 무기질 배양배지에서의 배양으로 바이오매스가 생산되는 배양 단계, 산소 희박 단계, 및 발효에 의해 숙신산이 실제로 생산되는 산소 결핍 단계를 포함한다. 이들 단계는 모두 동일한 발효기에서 수행되며, 예시용으로 SBS550MG-pHL413 균주를 사용하였다.

[0110] **전배양 단계:** SBS550MG-pHL413 균주를, 125 rpm으로 약하게 교반하면서, 37℃에서 24 시간 미만으로 삼각 플라스크 내에서 전배양시켰다. 전배양 배지 500ml를 접종균액의 동결관으로부터 2-리터 삼각 플라스크 내부로 접종하였다.

[0111] 본 전배양 배지의 조성은 다음과 같다:

트립톤	10 g/l
효모 추출물	5 g/l
NaCl	10 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.25 g/l
NaCl	0.5 g/l
항생제(암피실린, 카바니실린 또는 옥사실린)	67 mg/l

[0112]

[0113] **계대배양 단계:** 본 계대배양 배지의 조성은 다음과 같다:

글루코스	10 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/l
KCl	2 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	60 mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4 mg/l
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2 mg/l
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	20 mg/l
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.4 mg/l
비오틴	1 mg/l
티아민	1 mg/l
암피실린	67 mg/l

[0114]

[0115] 삼각 플라스크 내에서 전배양에 의해 얻은 접종균액은 발효기에서 배지배양된 총 부피의 6%를 차지한다. 37℃의 온도에서, 450 rpm으로 교반하면서, 0%를 초과하는 산소 분압 및 1 vvm의 포기(aeration)를 이용하여, 발효기 내에서 20 시간을 초과하여 계대배양을 수행하였다. 5N 소다용액을 이용하여 배양배지의 pH를 저점인 6.75로 조절하였다.

[0116] **산소가 풍부한 단계 및 산소가 희박한 단계:** 계대배양 이후, 다음과 같은 조성을 가진 배양배지 내 20L 발효기에 균주를 배치하였다:

글루코스: 초기에는 10 g/l, 소비 후 + 10 g/l	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/l
KCl	2 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	60 mg/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4 mg/l
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2 mg/l
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	20 mg/l
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.4 mg/l
비오틴	1 mg/l
티아민	1 mg/l
암피실린	67 mg/l

[0117]

[0118] 삼각 플라스크 내에서 전배양에 의해 얻은 접종균액은 발효기에서 배지배양된 총 부피의 13%를 차지한다. 포기(aeration)는 1 vvm에, 온도는 37℃에 유지하고, 5N 소다용액을 이용하여 배양배지의 pH를 저점인 6.75로 조절하였다. 우선, 배양배지를 450 rpm으로 교반함으로써 산소 분압이 20% 초과 상태에 유지되도록 하였다.

[0119] 균주에 의해 글루코스 10 g/l가 소비된 경우에는, 교반 속도를 400 rpm으로 낮추어 산소가 희박한 조건(산소 분압 <1%)으로 변경되도록 하였다.

[0120] **산소가 결핍된 단계:** 산소가 풍부한 단계 및 산소가 희박한 단계 이후에는, 산소를 공급하는 대신 0.2 vvm의 CO<sub>2</sub>를 주입하고, 37℃, 250 rpm으로 교반이 수행되는 산소 결핍 조건 하에 균주를 배치하였다. 5N NaOH 용액을 이용하여 배양배지의 pH를 저점인 6.75로 조절하였다. 산소 결핍 조건 하에 글루코스를 20 g/l로 배양배지에 첨가하였다.

[0121] 18 시간의 생산 이후의 결과들을 아래의 표에 정리하였다:

기체 산소가 풍부한 단계	배지 산소가 풍부한 단계	산소가 희박한 단계	pH 증가 산소가 풍부한 단계	비성장속도( $\mu$ ) h <sup>-1</sup> 호기성 단계	OD 600 nm 산소가 풍부한 단계	숙신산염 수율 (% g/g) CO <sub>2</sub> 단계	숙신산염 비속도(g/h/OD) CO <sub>2</sub> 단계
NaOH	MIN	있음	발생함	0.31	16.6	92	0.06

[0122]

[0123] 새로운 프로토콜을 이용하여, 산소가 풍부한 단계의 3가지 중요한 요인이 생산에 미치는 영향을 확인하였다.

[0124]

● 사용된 기체(NaOH/NH<sub>3</sub>).

[0125]

● 산소가 풍부한 단계 후의 산소 희박 단계(저함량의 산소)의 존재.

[0126]

● 산소 희박 단계가 끝나면 다시 증가하는 pH(생산된 산의 소비).

[0127]

이들 요인의 조합 각각에서 얻은 결과들(18 시간의 생산 이후)을 아래의 표에 정리하였다 - 앞서 제공된 기본 프로토콜을 이용하여 얻은 결과들은 하기 표의 세 번째 열에 제공되어 있다.

기체 산소가 풍부한 단계	배지 산소가 풍부한 단계	산소가 희박한 단계	pH 증가 산소가 풍부한 단계	비성장속도( $\mu$ ) h <sup>-1</sup> 호기성 단계	Abs 600 nm 산소가 풍부한 단계	숙신산염 수율 (% g/g) CO <sub>2</sub> 단계	숙신산염 비속도(g/h/OD) CO <sub>2</sub> 단계
NaOH	MIN	없음	발생안함	0.33	18.0	-	< 0.01
NaOH	MIN	있음	발생안함	0.30	16.1	85	0.33
	MIN	있음	발생함	0.31	16.6	92	0.06
NH <sub>3</sub>	MIN N	없음	발생안함	0.39	22.3	-	< 0.01
NH <sub>3</sub>	MIN N	있음	발생안함	0.33	17.9	68	0.05
NH <sub>3</sub>	MIN N	있음	발생함	0.34	17.2	71	0.05

[0128]

[0129] 이는 바이오매스의 비생산 속도(specific productivity)를 현저히 증가하기 위해서는(> 0.01 g/h/OD) 산소 희박 단계가 필요하다는 것을 보여준다. 호기성 단계 동안의 최종 pH 증가는 또한 수율 및 비속도 양측 모두에 긍정적인 효과를 미친다(숙신산의 수율은 생산 단계 동안에 소비된 글루코스에 근거하여 산출되며, g/g x 100으로 표현됨).

[0130]

전반적으로, 관찰된 이들 효과는 풍부한 배지를 이용하여 얻은 효과들에 유사하며, 이는 프로토콜의 타당성을 확인시켜 준다.

[0131]

**산소 희박 단계의 효과:** 이들 시험은 본 요인의 우수함을 확증해준다. 본 단계는 숙신산의 생산을 유도하기 위해 절대적으로 필수적이다. 산소 희박 단계 없이는(굵게 표현된 라인들을 참조), 숙신산염의 수율은 무시해도 좋은 정도의 수준으로 떨어진다.

[0132]

**NH<sub>3</sub>/Na의 효과 및 pH 관리:** 산소가 풍부한 단계 이후에 소다계 배지 상에서의 또 한 번의 추가적인 pH 증가 덕분에 바이오매스의 활성도 및 수율(92%)이 명백하게 향상된다.

[0133]

수산화암모늄의 사용은 성장의 향상 및 생산 단계에서 글루코스의 비소비 속도의 향상을 유도한다.

[0134]

**실시예 7: pH를 조절하지 않은 옥수수계 배지**

[0135]

본 실시예는 전배양 단계, 산소가 풍부한 조건 하에 옥수수 침출물을 질소 공급원으로 그리고 글루코스를 탄소 공급원으로 함유하는 배양배지 내에서의 배양 단계(이 단계에서 바이오매스가 생산됨), 산소 희박 단계, 및 숙신산이 실제로 생산되는 산소 결핍 단계를 포함한다. 예시용으로 SBS550MG-pHL413 균주를 사용하였다.

[0136]

**전배양 단계:** 실시예 2를 참조한다.

[0137]

**산소가 풍부한 단계 및 산소가 희박한 단계:** 전배양 이후, 다음과 같은 조성을 가진 배양배지 내, 400 rpm으로 교반되는 4L 발효기에 균주를 배치하였다:

글루코스: 초기에는 2 g/l, pH 증가 이후 + 2 g/l	
옥수수 침출물(Corn steep)	60 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 g/l
KCl	2 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0.2 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0.25 g/l
암피실린	0.067 g/l
비오틴	0.001 g/l
티아민	0.001 g/l

[0138]

[0139]

**산소가 결핍된 단계:** 이어서, 산소가 공급되는 대신 0.3 vvm의 CO<sub>2</sub>가 주입되고, 37°C, 250 rpm으로 교반이 수행되는 산소 결핍 조건 하에 균주를 배치되었다. 5N NaOH 용액을 이용하여 배양배지의 pH를 6.4로 조절하였다. 산소 결핍 조건 하에 글루코스를 20 g/L로 배양배지에 첨가하였다. 산소 결핍 조건 하에, 24 시간의 배양 이후에는 글루코스를 15 g/l로, 48 시간의 배양 이후에는 글루코스를 4 g/l로 첨가하였다.

[0140]

이렇게 얻어진 결과들을 다음과 같다:

누적 지속시간 (hours)	600nm에서의 흡광도 (OD)	글루코스 (g/L)	숙신산 (g/L)
산소가 풍부한 단계			
0	6	2.0	0.0
6.8	22	/	/
7.5	27	/	/
산소가 희박한 단계			
9	33.5	0.0	0.0
산소가 결핍된 단계 (9 시간 이후 CO <sub>2</sub> 하)			
24	20.0	0.6	15.5
글루코스를 15g/L로 첨가			
48	14.5	2.4	26.8
48 시간 이후 4 g/L로 글루코스 첨가			
50	16.5	5.8	26.9
54.5	/	4.2	28
72	13.5	0	32.3

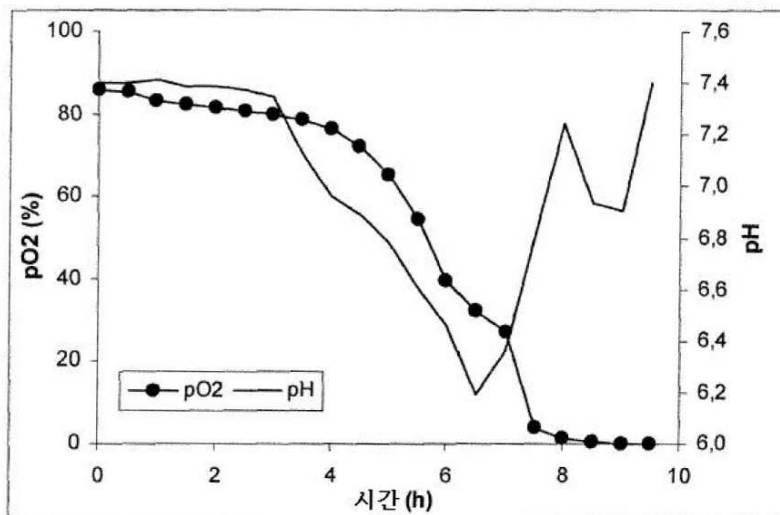
[0141]

[0142]

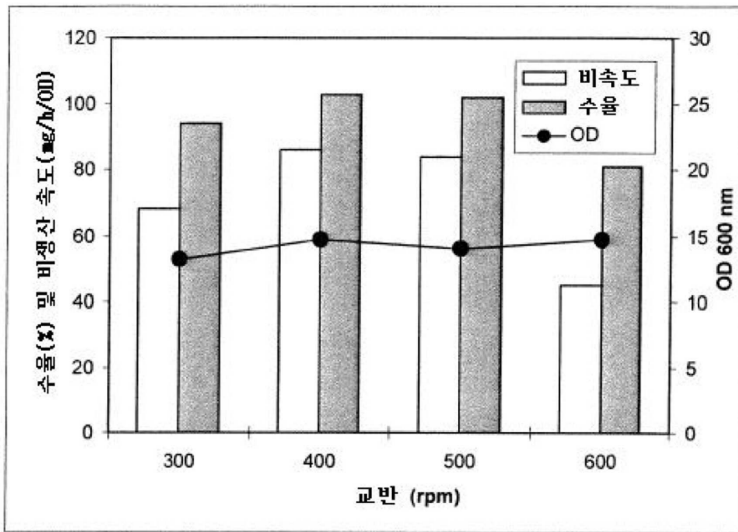
글루코스의 전체 수율: 88%

**도면**

**도면1**



도면2



교반	수율 (%)	OD	부피율 (g/l/h)	비속도 (g/l.h.OD)
300	94	13,2	0,8	68
400	103	14,7	1,1	86
500	102	14	1,0	84
600	81	14,7	0,5	45

도면3

