(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0082121
(43) 공개일자 2019년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/52 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/52 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0171230
(22) 출원일자 2018년12월27일
심사청구일자 2018년12월27일
(30) 우선권주장
1020170184155 2017년12월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
상병인
서울특별시 노원구 노원로 62, 308동 904호
전병승
서울특별시 영등포구 신길로60나길 9, 103동 401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **메가스파에라 헥사노이카 균주를 이용하여 이소발레르산과 헥사노익산을 동시에 생산하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 메가스파에라 헥사노이카 균주를 이용하여 이소발레르산과 헥사노익산을 동시에 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 메가스파에라 헥사노이카 균주를 효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)이 첨가된 조건하에서 배양함으로써 다양한 바이오화합물의 전구물질로 사용되는 이소발레르산과 헥사노익산을 고수율로 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도1

접종 균주	: *Megaspaera hexanoica* 2% 접종		
공통 배양조성	: Yeast extract	5	g/L
(control)	K_2HPO_4	2	g/L
	Salt solution	4	mL/L
	Cystein-HCl·H_2O	0.5	g/L
선택 배양조성	: Fructose	50	mM
	Leucine	50	mM
	Sodium acetate	50	mM

배지 별 선택 배양조건

Y: control	YFL: control+fructose+leucine
YF: control+fructose	YFA: control+fructose+sodium acetate
YL: control+leucine	YLA: control+leucine+sodium acetate
YA: control+sodium acetate	YFLA: control+fructose+leucine+sodium acetate

(52) CPC특허분류
C12R 1/01 (2013.01)
(72) 발명자
신승진
경상남도 창원시 성산구 동산로 115, 113동 1405호
주고운
대전광역시 유성구 어은로 57, 125동 803호
오민규
경기도 성남시 분당구 정자일로 248, 602동 1601호
김덕균
서울특별시 구로구 금오로 865, 102동 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20143030091040
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 에너지기술평가원
연구사업명 에너지기술개발사업
연구과제명 케톤-알코올 발효공정과 화학촉매공정을 융합한 고탄소 바이오연료 생산 기술
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2014.12.01 ~ 2017.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P)를 효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)이 첨가된 배양액에 접종하여 배양하는 단계;를 포함하는 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배양액은 아세트산 나트륨(sodium acetate)을 더 포함하는 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 효모 추출물의 농도는 10 내지 20 g/L인 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 프룩토스의 농도는 50 내지 150 mM인 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 루신의 농도는 50 내지 150 mM인 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 아세트산 나트륨의 농도는 100 내지 200 mM인 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 배양액은 K_2HPO_4, 시스테인-HCl·H_2O, 염 용액 또는 이들의 혼합물을 포함하는 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 배양액에 추출용매로서 올레일 알코올과 알라민 336의 혼합 용매를 첨가하는 것을 특징으로 하는 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법.

청구항 9

효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)을 포함하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 배양액은 아세트산 나트륨(sodium acetate)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 효모 추출물의 농도는 10 내지 20 g/L인 것을 특징으로 하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 프룩토스의 농도는 50 내지 150 mM인 것을 특징으로 하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 루신의 농도는 50 내지 150 mM인 것을 특징으로 하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 아세트산 나트륨의 농도는 100 내지 200 mM인 것을 특징으로 하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 배양액은 K_2HPO_4, 시스테인-HCl·H_2O, 염 용액 또는 이들의 혼합물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 메가스파에라 헥사노이카 균주를 이용하여 이소발레르산과 헥사노익산을 동시에 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 합성가스는 유기원료가 고온의 증기가 있는 조건에서 부분 산화될 경우에 발생하는 것으로 CO, H_2 및 CO_2를 주성분으로 하며, 원료로는 천연가스, 석탄, 유혈암(Oil shale) 및 역청사암(tar sand) 등이 사용될 수 있는데, 주로 천연가스 또는 석탄을 금속촉매 반응시킴으로써 제조하고 있다.

[0003] 금속촉매를 이용하여 합성가스를 다탄소화합물로 전환하는 기술은 합성가스의 순도(CO 및 H_2만 사용됨)가 매우 중요한데, 원료에 불순물이 포함되면 반응속도가 크게 감소하여 생산성이 떨어진다. 특히 불순물로 황화합물이 포함되는 경우에는 황화합물이 금속촉매를 비가역적으로 피독시키며, 촉매를 다시 활성화시키기 어렵고, 황화합물을 제거하기 위한 별도의 제조공정이 필요하며, CO나 H2를 농축시켜 사용해야 함으로 어려움이 있으며, 경제적이지 못하다.

[0004] 최근 바이오매스를 기화시켜 합성가스를 생산하는 기술이 개발되었는데, 바이오매스 이용공정은 석탄을 이용하는 경우보다 합성가스에 포함된 황화합물의 농도를 낮게 할 수 있거나 적은 에너지로 사용할 수 있으며, 더 낮

은 온도(석탄:1500-1800℃, 바이오매스: 1100℃)에서 상대적으로 짧은 반응시간에 합성할 수 있어 주목받고 있다.

[0005] 이러한 바이오매스 유래의 합성가스를 이용할 수 있는 미생물로 아세토젠(Acethgens)이 있다. 호모아세토젠(Homoacetogen)이라고 정의하는 상기 미생물들은 우드-융달 경로(Wood-Ljungdahl pathway)를 통하여 CO나 H_2를 유일한 에너지원으로 생장하는 혐기성 미생물로 대사경로 상에서 acethyl-CoA synthease(또는 carbon monoxide dehydrogenase, 이하, CODH)라는 효소를 가지고 있는데, CODH는 CO의 산화, CO_2의 환원에 관여한다. 우드-융달 경로를 이용하면 합성가스를 별도의 정제나 농축공정 없이 유기산으로 전환시킬 수 있고, 상온 및 상압에서 이루어지며, 황 불순물에 영향을 받지 않으므로 이를 이용한 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있다. 현재까지 합성가스를 발효하는 것으로 알려진 세균으로는 Clostridium ljungdahlii(Enzyme and Microbial Technology 14(8), 1992 602-608.; Applied Biochemistry and Biotechnology 45(6), 1994 145-157.; Biochemical Engineering Journal 27, 2005 110-119.), Clostridium autoethanogenum(Archives of Microbiology 161 (4), 1994345-351.), Clostridium carboxidivorans P7(Biotechnology and Bioengineering 97 (5), 2007 1080-1086.; Biomass and Bioenergy 23(6), 2002 487-493.) 및 Clostridium ragsdalei P11(미국등록특허 제7,704,723호) 등이 있다.

[0006] 한편, 탄소수가 5개인 이소발레르산은 향료, 약제조성물로 쓰일 뿐만 아니라 각종 병리현상 연구의 목적으로 사용되는 유기산으로, 서양쥐오줌풀(Valeriana), 꽃박하(Origanum majorana), 호프(Hop) 및 동물 지질로부터 얻을 수 있으나, 채산성이 매우 낮아 채유가 어렵다는 문제점이 있다. 대한민국등록특허 제0372218호에는 만헤이미아속 55E 및 전기균주를 혐기적인 또는 호기적인 조건에서 배양하여 유기산을 생산하는 방법에 관한 것으로, 이산화탄소로 포화된 혐기적 조건에서 숙신산, 젖산, 및 개미산을 생산하고 있으며, 미국공개특허 제2008/0311640호에서는 다양한 미생물을 이용하여 수소 및 유기산을 생산하고 있으나, 상기와 같은 종래 발명들은 acethyl-CoA pathway를 통해 아세테이트, 에탄올, 부틸레이트, 부탄올 등의 탄소수가 2 및 4개인 유기산을 생산하는데 불과하다. 따라서 탄소수가 2 내지 5개인 유기산, 특히, 이소발레르산을 생산할 수 있도록 생물학적 화합물 생산의 범위가 확대된 균주에 대한 연구가 요구되는 시점이다.

[0007] 또한, 헥사노익산은 6개의 탄소를 가지는 직선형의 지방산으로서 향수, 약, 윤활 그리스, 고무, 염료 등을 만드는데 사용되고 있으며, 단순 촉매 반응을 통해 헥사놀(hexanol)로 전환될 수 있다. 헥사놀은 에스테르화(esterification)를 통해서 가솔린, 디젤, 제트 연료로 사용할 수 있는바, 바이오 연료의 전구물질로서 헥사노익산을 생산하는 기술의 개발이 필요하다. 미생물 발효를 이용한 헥사노익산 생산은 1942년에 발표된 혐기성 세균인 클로스트리디움 클루이베리(Clostridium kluyveri)를 이용한 헥사노익산 생산 관련 연구가 가장 많이 진행된 균 중에 하나이다. 위 균주는 에탄올과 아세테이트 혹은 숙시네이트를 이용하여 H2, 부티르산, 헥사노산을 생산할 수 있다. 아세트산이 과잉 될수록 헥사노익산이 주로 생산이 되는데 이들의 관계에서 부티르산이 헥사노익산 합성과정에서 중간 물질로 사용된다는 사실이 밝혀졌다. Rodick et al.은 헥사노산의 생산량을 증가시키기 위해서 이온교환 수지인 amberlite IRA-400가 포함된 배양기에서 고정화된 메가스페라 엘스데니(Megasphaera elsdenii)를 유가 배양하여 헥사노산 생산 수율을 기존 6 g/L에서 19 g/L로 30% 증가시켰다고 보고한 바 있고, 종래 한국등록특허 제10-1316732호에서는 메가스페라 엘스데니 NCIMB 702410을 이용 및 추출발효를 통해 헥사노산의 생산량을 증가시키는 방법을 개시한 바 있으나, 생산량이 충분하지 않아 바이오 연료의 생산 공정에 적용하기에는 미흡한 실정이다.

[0008] 또한, 종래 한국등록특허 제10-1745084호에서는 메가스파에라 헥사노이카 균주를 이용하여 헥사노익산을 생산하는 방법을 개시한바 있으나, 현재까지 상기 균주를 이용하여 이소발레르산과 헥사노익산을 동시에 생산하는 방법은 보고된바 없다.

[0009] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 이소발레르산의 생산 방법에 대해 연구 중, 헥사노익산을 생산하는 균주로 알려진 메가스파에라 헥사노이카 균주의 루신 대사 경로를 이용할 경우 이소발레르산과 헥사노익산을 고수율로 동시에 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Roddick, F.A. and M.L. Britz, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1997 69(3) 383-391.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 메가스파에라 헥사노이카 균주를 이용하여 이소발레르산 헥사노익산을 동시에 생산하는 방법 및 메가스파에라 헥사노이카 균주 배양용 배양액을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P)를 효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)이 첨가된 배양액에 접종하여 배양하는 단계;를 포함하는 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)을 포함하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액을 제공한다.

[0014] 본 발명에 따르면, 상기 배양액은 아세트산 나트륨(sodium acetate)를 더 포함할 수 있다.

[0015] 이때, 상기 효모 추출물의 농도는 10 내지 20 g/L일 수 있다.

[0016] 또한, 상기 프룩토스의 농도는 50 내지 150 mM일 수 있다.

[0017] 또한, 상기 루신의 농도는 50 내지 150 mM일 수 있다.

[0018] 또한, 상기 아세트산 나트륨의 농도는 100 내지 200 mM일 수 있다.

[0019] 본 발명에 따르면, 상기 배양액은 K_2HPO_4, 시스테인-HCl · H_20, 염 용액 또는 이들의 혼합물을 포함하는 배양액일 수 있다.

[0020] 본 발명에 따르면, 상기 배양액에 추출용매로서 올레일 알코올과 알라민 336의 혼합 용매를 첨가할 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따르면 메가스파에라 헥사노이카 균주를 효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)이 첨가된 조건하에서 배양함으로써 다양한 바이오화합물의 전구물질로 사용되는 이소발레르산과 헥사노익산을 고수율로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 메가스파에라 헥사노이카 균주의 배양 조건을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 실시예 1에 따른 조건별 메가스파에라 헥사노이카 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 실시예 1에 따른 조건별 유기산 생산량을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 2에 따른 메가스파에라 헥사노이카 균주의 배양 조건을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 실시예 2에 따른 메가스파에라 헥사노이카 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실시예 2에 따른 조건별 유기산 생산량을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실시예 3-1에 따른 반응표면분석법을 적용하기 위한 변수(효모 추출물, 루신, 아세트산 나트륨)들의 농도 및 이에 따른 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량을 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명의 실시예 3-1에 따른 반응표면분석법을 통해 얻은, 이소발레르산과 헥사노익산의 생산 농도에 대하여 통계학적 방법을 통해 각 변수들이 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

도 9는 도 8에 따른 결과를 수치화한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 실시예 3-2에 따른 반응표면분석법을 적용하기 위한 변수(효모 추출물, 아세트산 나트륨)들의 농도 및 이에 따른 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량을 나타낸 도면이다.

도 11은 본 발명의 실시예 3-2에 따른 반응표면분석법을 통해 얻은, 이소발레르산과 헥사노익산의 생산 농도에 대하여 통계학적 방법을 통해 각 변수들이 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

도 12는 반응표면분석법을 통해 도출된 최적 조건을 적용하여 메가스파에라 헥사노이카 균주 배양시 상기 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이다.

도 13은 반응표면분석법을 통해 도출된 최적 조건을 적용하여 메가스파에라 헥사노이카 균주 배양시 배양 시간에 따른 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0025] 본 발명에서는 종래 헥사노익산을 생산하는 균주로 알려진 메가스파에라 헥사노이카 균주의 루신 대사 경로를 이용하여 이소발레르산과 헥사노익산을 고수율로 동시에 생산하는 방법을 제공하고자 한다.

[0026] 이를 위해, 본 발명은 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P)를 효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)이 첨가된 배양액에 접종하여 배양하는 단계;를 포함하는 이소발레르산과 헥사노익산의 동시 생산방법을 제공한다.

[0027] 이때, 상기 배양액은 기본 배지의 성분으로서 K_2HPO_4, 시스테인-HCl·H_2O, 염 용액 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것이 바람직하다.

[0028] 또한, 상기 배양액은 이소발레르산과 헥사노익산의 수율을 더욱 향상시기키 위해, 상기 기본 배지에 첨가된 상기 효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)외에 아세트산 나트륨(sodium acetate)을 더 포함하는 것이 바람직하다.

[0029] 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 전술한 기본 배지 성분에 효모 추출물, 프룩토스 및 루신을 첨가하거나, 추가적으로 아세트산 나트륨을 더 첨가할 경우 본 발명에 따른 메가스파에라 헥사노이카 균주가 효율적으로 생장함과 동시에 이소발레르산과 헥사노익산을 동시에 가장 잘 생산하는 것으로 나타났는바, 효모 추출물, 프룩토스, 루신 및 아세트산 나트륨이 이소발레르산과 헥사노익산 생산에 중요한 영향을 미치는 인자이며, 이들의 상호 작용을 통해 이소발레르산과 헥사노익산 생산량이 증가하는 것으로 밝혀졌다.

[0030] 또한, 반응표면 분석법을 통해 이소발레르산과 헥사노익산의 생산 수율을 향상시키기 위한 상기 인자들의 최적 농도 조건을 도출하였으며, 이에 따라 상기 효모 추출물의 농도는 10 내지 20 g/L인 것이 바람직하고, 상기 프룩토스의 농도는 50 내지 150 mM인 것이 바람직하며, 상기 루신의 농도는 50 내지 150 mM인 것이 바람직하고, 상기 아세트산 나트륨의 농도는 100 내지 200 mM인 것이 바람직하다.

[0031] 또한, 이소발레르산과 헥사노익산을 최대로 생산하기 위해서는 루신의 농도가 150 mM인 조건하에서 효모 추출물의 농도는 18.83 g/L, 아세트산 나트륨의 농도는 151.87 mM인 것이 가장 바람직하다.

[0032] 또한, 배지 내 유기산의 농도를 줄여 미생물에 미치는 독성을 줄임으로써 이소발레르산과 헥사노익산의 생상량을 더욱 향상시키기 위해 상기 메가스파에라 헥사노이카 균주를 배양시 배양액에 추출 용매로서 올레일 알코올과 알라민 336의 혼합 용매를 첨가할 수 있다.

[0033] 이때, 상기 올레일 알코올과 알라민 336의 부피비는 9:1 내지 6:3인 것이 바람직하다. 상기 범위를 벗어나 알라민 336의 양이 너무 많아지면 미생물의 독성이 유발되어 생육이 저해될 수 있다. 또한, 상기 배양액과 상기 혼합 용매의 부피비는 1:0.5 내지 1:2인 것이 바람직하다.

[0034] 본 발명은 또한, 효모 추출물(Yeast extract), 프룩토스(fructose) 및 루신(Leucine)을 포함하는 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액을 제공한다.

[0035] 상기 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P) 배양용 배양액과 관련하여, 상기 메가스파에라 헥사노이카(Megasphaera hexanoica) 균주(KCCM11835P)를 배양하여 이소발레르산과 헥사노익산을 동시 생산하는 방법과 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기

재를 생략한다.

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0039] **메가스파에라 헥사노이카 균주의 분리**

[0040] 헥사노익산을 생산하는 미생물을 분리하기 위해 대한민국 서울시 마장동에 위치한 우시장에서 위액이 포함된 소 내장을 구매하고 이를 혐기적으로 처리하였다. 상기 혐기적으로 처리된 위액을 5 g/L hexanoic acid가 포함된 Reinforced Clostridia medium (difco)에 접종하여 37 ℃에서 3일간 증균 배양시켰다. 이 증균 배양액을 동일한 배지에 수차례 계대 배양하였다. 증균 배양한 배양액은 Reinforced Clostridia medium (difco)배지에 도말하여 콜로니를 형성시켰다.

[0041] 선발된 각각의 콜로니들을 Reinforced Clostridia medium (difco) 액체 배지에 접종하여 37 ℃에서 3일간 배양 후, 기체 크로마토그래피(Gas chromatography, GC)를 이용하여 헥사노산 생산량을 측정하였다. 그 결과, 가장 많은 양의 헥사노산을 생산하는 미생물을 분리하였다. 분리된 미생물을 부다페스트 조약에 따른 미생물 기탁기관인 대한민국 한국미생물보존센터에 2016년 04월 28일자로 기탁하여 기탁번호 KCCM11835P를 부여받았다.

[0043] **실시예 1. 효모 추출물이 포함된 기본 배지에 프룩토스, 루신, 아세트산 나트륨 첨가 여부에 따른 메가스파에라 헥사노이카의 생장 및 유기산 생산 경향 분석**

[0044] *Megaspaera hexanoica*의 배양에서 배지의 조성이 균주의 생장, 생산되는 유기산의 종류 및 그 양에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 효모 추출물이 포함된 기본 배지에 프룩토스(Fructose, F), 루신(Leucine, L) 및 아세트산 나트륨(sodium acetate, A)의 첨가 유무를 변화시켜 실험을 진행하였다. 하기 도 1에 도시한 바와 같이 프축토스, 루신, 아세트산 나트륨의 첨가 여부에 따라 총 8종의 배지를 제조하였으며, 배지의 양은 모두 20 mL로 하여 메가스파에라 헥사노이카 균주 400 ㎕(2%)를 접종하였다. 10~15시간 간격으로 optical density(600 nm)를 측정하여 사멸기에 들어갈 때까지 샘플링을 진행하였으며, 총 72시간 동안 샘플링을 하고 성분별로 유기산의 생산량과 소비량을 mmol/L(mM) 단위로 계산하였다.

[0045] 도 2는 전술한 조건별 메가스파에라 헥사노이카 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이고, 도 3은 조건별 유기산 생산량을 비교한 결과를 나타낸 것이다. 도 2 및 도 3에 도시된 바와 같이, 효모 추출물만 포함된 기본 배지(control)와 상기 기본 배지에 루신(YL) 또는 아세트산 나트륨(YA)만 첨가된 배지의 경우 메가스파에라 헥사노이카가 자라지 않고, 따라서 타겟 물질인 이소발레르산과 헥사노익산이 전혀 검출되지 않는 것으로 나타났다. 또한, 효모 추출물이 포함된 기본 배지에 프룩토스와 루신이 첨가되거나(YFL), 프룩토스, 루신 및 아세트산 나트륨(YFLA)이 첨가될 경우 메가스파에라 헥사노이카가 잘자람과 동시에 이소발레르산과 헥사노익산이 동시에 고수율로 생산되며, 특히 YFLA의 경우 생산된 이소발레르산과 헥사노익산의 농도가 각각 20.5 mM와 19.6 mM으로 최대 생산량을 보인다는 것을 확인하였다. 결과적으로, 이소발레르산의 생산을 위해서는 메가스파에라 헥사노이카가 잘자랄 수 있는 조건 하에서 루신의 첨가가 함께 동반되어야 한다는 것을 확인하였으며, 루신과 함께 프룩토스, 아세트산 나트륨이 첨가될 경우 이소발레르산의 생산성이 더욱 향상됨과 동시에 헥사노익산을 고수율로 동시 생산할 수 있다는 점을 확인하였다.

[0047] **실시예 2. 메가스파에라 헥사노이카 균주의 생장 및 유기산 생산량에 가장 큰 영향을 미치는 성분 확인**

[0048] 상기 실시예 1에서 도출된 결과를 바탕으로, 효모 추출물이 포함된 기본 배지에 프룩토스, 루신 및 아세트산 나트륨이 모두 포함된 배지(YFLA)를 이용하여 균주의 생장 및 이소발레르산을 비롯한 유기산 생산량에 가장 큰 영향을 미치는 주요 성분이 무엇인지를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 구체적으로, 하기 도 3에 도시한 바와 같이, YFLA 배지(control), 상기 YFLA 배지에서 효모 추출물의 농도만 2배로 첨가한 배지(A), 상기 YFLA 배지에서 아세트산 나트륨의 농도만 2배로 첨가한 배지(B), 상기 YFLA 배지에서 효모 추출물, 아세트산 나트륨, 프룩

토스 및 루신의 농도를 모두 2배로 첨가한 배지(C), 상기 YFLA 배지에서 프룩토스의 농도만 2배로 첨가한 배지(D), 상기 YFLA 배지에서 루신의 농도만 2배로 첨가한 배지(E) 등 총 6종의 배지를 제조하였으며, 배지의 양은 모두 20 mL로 하여 메가스파에라 헥사노이카 균주 400 ㎕(2%)를 접종하였다. 5~8시간 간격으로 optical density(600 nm)를 측정하여 사멸기에 들어갈 때까지 샘플링을 진행하였으며, 총 72시간 동안 샘플링을 하고 성분별로 유기산의 생산량과 소비량을 mmol/L(mM) 단위로 계산하였다.

[0049] 도 5는 전술한 조건별 메가스파에라 헥사노이카 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이고, 도 6은 조건별 유기산 생산량을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

[0050] 도 5 및 도 6에 도시된 바와 같이, YFLA 배지에서 효모 추출물을 더 첨가해준 배지(A, C)에서 메가스파에라 헥사노이카 균주가 가장 잘 자라는 것으로 나타났다. 또한, 이소발레르산의 생산량은 YFLA 배지 대비 나머지 조건들에서 모두 향상된 결과를 나타내었으며 특히 루신이 더 첨가되거나(E), 루신, 효모 추출물, 프룩토스, 아세트산 나트륨이 모두 더 첨가된 배지(C)에서 이소발레르산의 생산량이 크게 향상되는 것을 확인하였으며(C는 45 mM, E는 34 mM), 루신, 효모 추출물, 프룩토스, 아세트산 나트륨이 모두 더 첨가된 배지(C)에서 이소발레르산의 생산량이 가장 높다는 것을 확인하였다. 결과적으로, 메가스파에라 헥사노이카 균주의 생장에는 효모 추출물이 가장 큰 영향을 미치며, 이소발레르산의 생산에는 루신이 가장 큰 영향을 미친다는 것을 확인하였으며, 루신과 함께 효모 추출물, 프룩토스, 아세트산 나트륨이 첨가될 경우 이소발레르산의 생산성이 더욱 향상된다는 것을 확인하였다.

[0052] **실시예 3. 효모 추출물, 이소발레르산 및 아세트산 나트륨을 변수로 한 반응표면분석법을 통해 도출한 이소발레르산과 헥사노익산의 최대 생산 조건**

[0053] **(1) 실시예 3-1**

[0054] 본 발명의 메가스페라 헥사노이카 균주 배양시 균주의 생장, 이소발레르산과 헥사노익산의 생산에 영향을 끼치는 변수로서, 효모 추출물, 루신 및 아세테이트를 선정하여 반응표면분석법[Response Surface Methodology(RSM), Software Design-Expert(Version 7.1.5, Sate-Ease Inc., Minneapolis, U.S.A)]을 통해 최적 조건을 분석하였다. 이때, 효모 추출물의 농도 범위는 5-15 g/L, 루신과 아세트산 나트륨의 농도 범위는 50-150 mM으로 설정하였다.

[0055] 도 7은 실시예 3-1에 따른 반응표면분석법을 적용하기 위한 변수(효모 추출물, 루신, 아세트산 나트륨)들의 농도 및 이에 따른 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량을 나타낸 도면이고, 도 8은 상기 반응표면분석법을 통해 얻은, 이소발레르산과 헥사노익산의 생산 농도에 대하여 통계학적 방법을 통해 각 변수들이 미치는 영향을 나타낸 결과이며, 도 9는 도 8에 따른 결과를 수치화한 것이다.

[0056] 측정 결과, 상기 변수들 즉 효모 추출물, 루신, 아세트산 나트륨의 농도가 증가할 수록 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량이 증가하는 경향을 보였으며, 상기 변수들 모두 설정한 범위 중 최대 농도에 해당할 때 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량이 가장 높은 것으로 확인되었다. 이를 통해 세가지 변숙 즉 효모 추출물, 루신, 아세트산 나트륨이 서로 시너지 효과를 발휘하며 이들의 농도가 모두 증가할 수록 이소발레르산과 헥사노익산의 생산성이 더욱 향상된다는 것을 확인하였다.

[0057] **(2) 실시예 3-2**

[0058] 상기 실시예 3-1에 설정된 변수들의 농도 범위에서 농도가 증가할 수록 유기산의 생산량이 증가하는 경향을 확인한 것을 바탕으로, 상기 변수들의 최적 값을 도출하기 위하여 루신의 농도를 150 mM(루신의 경우 헥사노이카 배양 온도인 37 ℃에서 최대 용해 농도임)으로 고정하고, 효모 추출물의 농도 범위는 10-20 g/L, 아세트산 나트륨의 농도 범위는 100-200 mM으로 설정한 후 상기 실시예 3-1과 동일한 방법에 따라 반응표면분석 실험을 진행하였다.

[0059] 도 10은 실시예 3-2에 따른 반응표면분석법을 적용하기 위한 변수(효모 추출물, 아세트산 나트륨)들의 농도 및 이에 따른 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량을 나타낸 도면이고, 도 11은 실시예 3-2에 따른 반응표면분석법을 통해 얻은, 이소발레르산과 헥사노익산의 생산 농도에 대하여 통계학적 방법을 통해 각 변수들이 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

[0060] 측정 결과, 효모 추출물 19.81 g/L, 아세트산 나트륨의 농도 151.87 mM 및 루신의 농도 150 mM인 조건에서 생산된 이소발레르산의 농도가 63.24 mM으로 최대 생산량을 보이는 것을 확인하였다. 다만, 헥사노익산의 생산성을

함께 고려한 결과, 효모 추출물 18.83 g/L, 아세트산 나트륨의 농도 151.87 mM 및 루신의 농도 150 mM인 조건에서 생산된 헥사노익산의 농도가 37.3304 mM으로 최대 생산량을 보이며, 이소발레르산의 농도 또한 62.9895 mM으로 현저히 향상된 생산성을 보이는 것을 확인하였다.

[0062] **실시예 4. 반응표면분석법을 통해 도출한 최적 조건 검증 실험**

[0063] 상기 실시예 3-2에 따라 도출된 최적 조건(효모 추출물 18.83 g/L, 아세트산 나트륨의 농도 151.87 mM 및 루신의 농도 150 mM인 조건)하에서 메가스파에라 헥사노이카 균주를 배양할 경우 균주의 생장, 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량이 실제 향상되는지 여부를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

[0064] 도 12는 실시예 3-2에 따른 반응표면분석법을 통해 도출된 최적 조건을 적용하여 메가스파에라 헥사노이카 균주 배양시 상기 균주의 생장 곡선을 나타낸 것이고, 도 13은 실시예 3-2에 따른 반응표면분석법을 통해 도출된 최적 조건을 적용하여 메가스파에라 헥사노이카 균주 배양시 배양 시간에 따른 이소발레르산과 헥사노익산의 생산량을 나타낸 것이다.

[0065] 측정 결과, 실시예 3-2에 따른 반응표면분석법을 통해 도출된 최적 조건하에서 메가스파에라 헥사노이카 균주 배양 시 균주의 생장이 잘 진행되며, 이소발레르산의 생산량은 63.5 mM(6.5 g/L)으로 반응표면분석법에 따른 결과와 거의 일치하는 것을 확인하였으며, 헥사노익산의 생산량은 50.9 mM(5.9 g/L)으로, 반응표면분석법에 따른 결과보다 더욱 향상된 생산성을 보이는 것을 확인하였다.

수탁번호

[0066]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11835P

수탁일자 : 20160428

도면

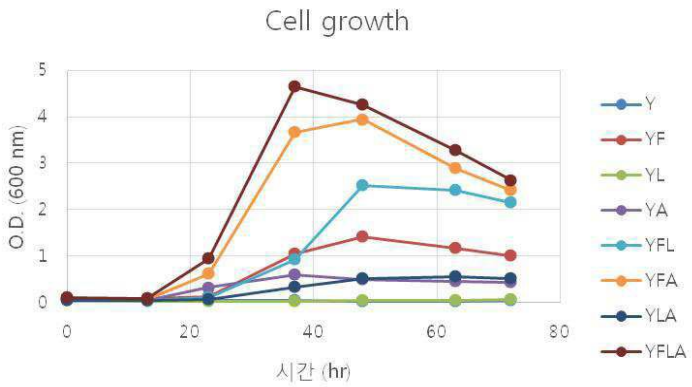
도면1

접종 균주	: *Megaspaera hexanoica* 2% 접종		
공통 배양조성	: Yeast extract	5	g/L
(control)	K_2HPO_4	2	g/L
	Salt solution	4	mL/L
	Cystein-HCl·H_2O	0.5	g/L
선택 배양조성	: Fructose	50	mM
	Leucine	50	mM
	Sodium acetate	50	mM

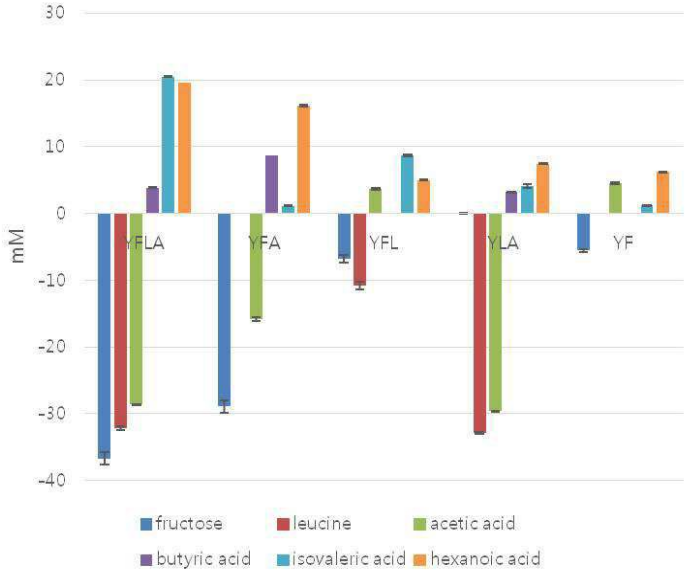
배지 별 선택 배양조건

Y: control	YFL: control+fructose+leucine
YF: control+fructose	YFA: control+fructose+sodium acetate
YL: control+leucine	YLA: control+leucine+sodium acetate
YA: control+sodium acetate	YFLA: control+fructose+leucine+sodium acetate

도면2



도면3



도면4

접종 균주	: *Megaspaera hexanoica* 2% 접종		
공통 배양조성	: Yeast extract	5	g/L
(control)	K_2HPO_4	2	g/L
	Salt solution	4	mL/L
	Cystein-HCl·H_2O	0.5	g/L
	Fructose	50	mM
	Leucine	50	mM
	Sodium acetate	50	mM

배지 별 선택 배양조건

Ctr: control

A: control + yeast extract 5 g/L

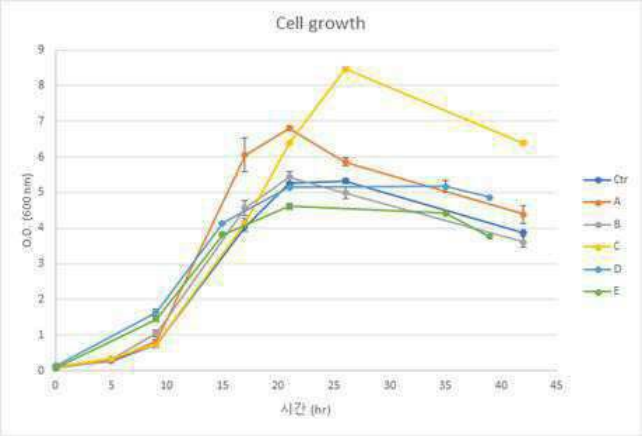
B: control + sodium acetate 50 mM

C: control + yeast extract 5 g/L + sodium acetate, fructose, leucine 각 50 mM

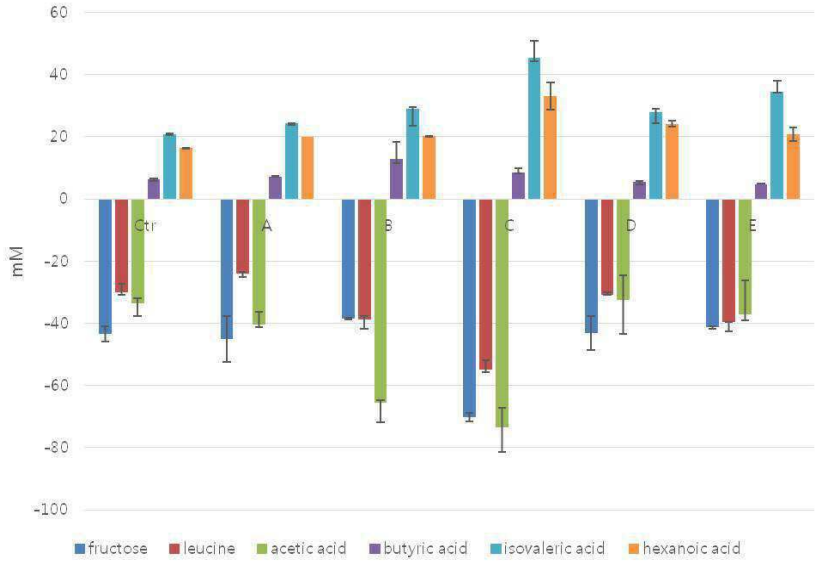
D: control + fructose 50 mM

E: control + leucine 50 mM

도면5


Cell growth
O.D. (600 nm)
시간 (hr)
Ctr
A
B
C
D
E

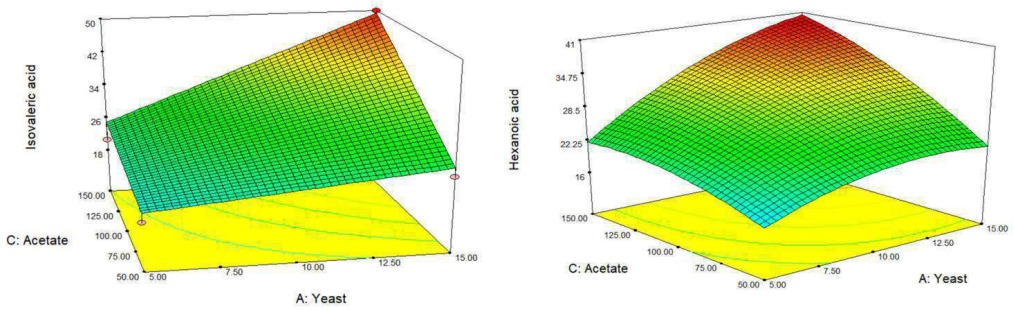
도면6


mM
Ctr
A
B
C
D
E
fructose
leucine
acetic acid
butyric acid
isovaleric acid
hexanoic acid

도면7

	Std	Run	Block	Factor 1 A:Yeast g/L	Factor 2 B:Leucine mM	Factor 3 C:Acetate mM	Response 1 Isovaleric acid mM	Response 2 Hexanoic acid mM
	4	1	Block 1	15.00	150.00	50.00	24.7772	21.8621
	3	2	Block 1	5.00	150.00	50.00	18.3296	18.1637
	18	3	Block 1	10.00	100.00	100.00	26.3253	28.6002
	7	4	Block 1	5.00	150.00	150.00	20.5473	22.5904
	15	5	Block 1	10.00	100.00	100.00	21.7899	30.4442
	12	6	Block 1	10.00	184.09	100.00	32.5086	29.9483
	9	7	Block 1	1.59	100.00	100.00	8.25712	9.86829
	8	8	Block 1	15.00	150.00	150.00	49.8688	37.8435
	17	9	Block 1	10.00	100.00	100.00	28.4578	31.0124
	14	10	Block 1	10.00	100.00	184.09	44.8399	37.5904
	11	11	Block 1	10.00	15.91	100.00	10.9596	26.751
	5	12	Block 1	5.00	50.00	150.00	14.1232	20.3848
	19	13	Block 1	10.00	100.00	100.00	28.6635	30.3564
	1	14	Block 1	5.00	50.00	50.00	14.0909	20.9788
	10	15	Block 1	18.41	100.00	100.00	34.6353	34.0057
	20	16	Block 1	10.00	100.00	100.00	29.0982	31.0227
	6	17	Block 1	15.00	50.00	150.00	33.0579	39.2097
	13	18	Block 1	10.00	100.00	15.91	14.0057	10.9504
	2	19	Block 1	15.00	50.00	50.00	19.8218	26.0124
	16	20	Block 1	10.00	100.00	100.00	32.6936	33.9153

도면8



도면9

Response 1 Isovaleric acid

ANOVA for Response Surface Reduced 2FI Model

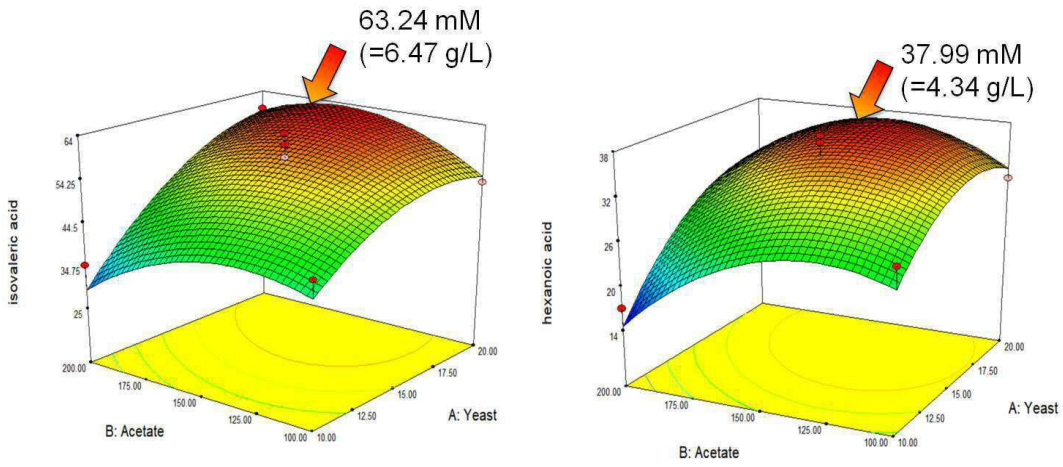
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1937.79	4	484.45	22.27	< 0.0001	significant
A-Yeast	*804.17*	*1*	*804.17*	*36.96*	*< 0.0001*	
B-Leucine	*345.29*	*1*	*345.29*	*15.87*	*0.0012*	
C-Acetate	*625.63*	*1*	*625.63*	*28.76*	*< 0.0001*	
AC	*162.70*	*1*	*162.70*	*7.48*	*0.0154*	
Residual	326.34	15	21.76			
Lack of Fit	*261.24*	*10*	*26.12*	*2.01*	*0.2289*	*not significant*
Pure Error	*65.10*	*5*	*13.02*			
Cor Total	2264.14	19				

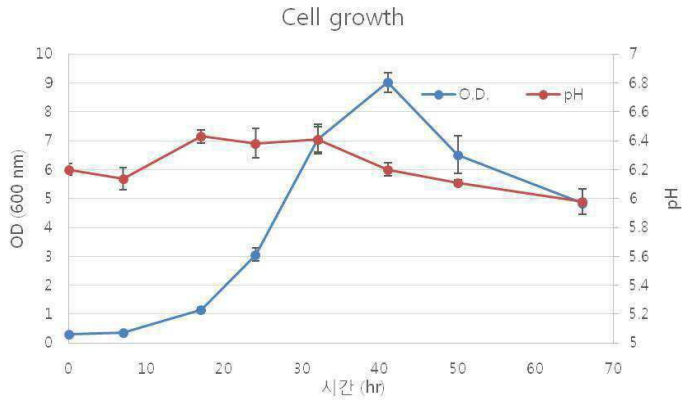
도면10

	Std	Run	Block	Factor 1 A:Yeast g/L	Factor 2 B:Acetate mM	Response 1 isovaleric acid mM	Response 2 hexanoic acid mM
	11	1	Block 1	15.00	150.00	63.2429	37.9907
	4	2	Block 1	20.00	200.00	59.7229	28.1594
	2	3	Block 1	20.00	100.00	51.0183	30.1911
	10	4	Block 1	15.00	150.00	60.7559	35.0551
	6	5	Block 1	22.07	150.00	62.7387	36.9189
	9	6	Block 1	15.00	150.00	53.8138	34.3578
	1	7	Block 1	10.00	100.00	44.3161	28.1078
	8	8	Block 1	15.00	220.71	39.1658	19.0556
	13	9	Block 1	15.00	150.00	57.838	37.1298
	3	10	Block 1	10.00	200.00	35.0534	17.0412
	7	11	Block 1	15.00	79.29	44.6588	27.1694
	12	12	Block 1	15.00	150.00	56.291	34.9174
	5	13	Block 1	7.93	150.00	25.5606	15.5992

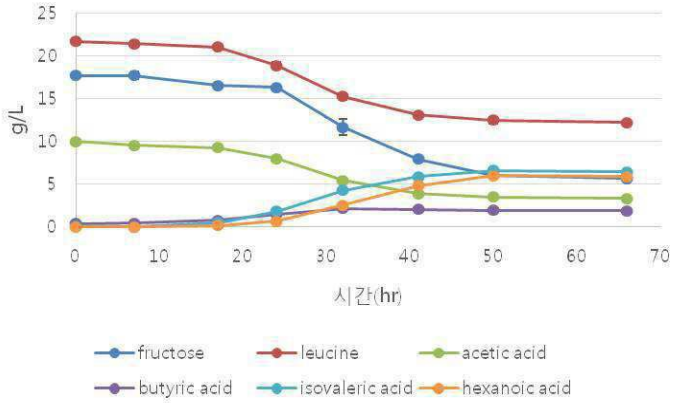
도면11



도면12



도면13


25
20
15
10
5
0
g/L
0
10
20
30
40
50
60
70
시간(hr)
fructose
leucine
acetic acid
butyric acid
isovaleric acid
hexanoic acid