

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁵
C12P 19/40(45) 공고일자 1992년07월24일
(11) 공고번호 92-005919

(21) 출원번호	특1983-0003467	(65) 공개번호	특1984-0005487
(22) 출원일자	1983년07월26일	(43) 공개일자	1984년11월14일
(30) 우선권주장	131664/1982 1982년07월27일 일본(JP)		
(71) 출원인	다께다야꾸힝고오교 가부시끼가이샤 구라바야시 이꾸시로 일본국 오오사까시 히가시꾸 도쇼오마찌 2조메 27반찌		

(72) 발명자 미야가와 겐이지로
일본국 오오사까후 이바라끼시 가스가 4쵸메 1방 18-402고
도이 무네하루
일본국 효오고깽 다까라즈까시 히라이 2쵸메 11방 11고
아끼야마 쓸兼
일본국 가나가와깽 후지사와시 후지사와 96반찌

(74) 대리인 이준구, 백락신

심사관 : 이성우 (책자공보 제2864호)**(54) 이노신, 구아노신 또는 그의 혼합물의 제조방법****요약**

내용 없음.

영세서

[발명의 명칭]

이노신, 구아노신 또는 그의 혼합물의 제조방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 이노신 및/또는 구아노신의 제조방법에 관한 것이다.

이노신 및 구아노신은 조미료, 즉 5'-이노신산 및 5'-구아닐산의 합성 제조의 중요한 출발물질이며, 조미료를 대량 생산하는데 있어 상업용으로 매우 중요하다. 발효에 의한 이노신 및/또는 구아노신의 생산을 위해, 아데닌/아데노신 저항, GMP환원 효소 결핍 및 뉴클레오티드 포스포릴리아제 결핍과 같은 특성 중하나 이상을 갖춘 변이주를 사용하는 것이 공업적 관점에서 유리하게 생각되고 있다.

이노신 및/또는 구아노신을 생산하는 공지의 발효 생산 방법을 향상시키려는 본 발명자들의 광범위한 연구의 결과, 성장을 위해 아데닌을 필요로 하는 바실루스 속의 이노신 및/또는 구아노신 생산 미생물에 의한 이노신 및/또는 구아노신의 촉적은 메토트랙세이트, 아미노프테린, 피리메타민, 트리메토프림등과 같은 안티 폴레이트(antifolates)에 저항성을 갖는 미생물에 의해 현저히 증가될 수 있다는 것이 발견되었다.

그러므로 본 발명은 성장을 위해 아데닌을 필요로 하며, 안티폴레이트에 저항성을 가지며, 이노신 및/또는 구아노신을 생산할 수 있는 바실루스속의 변이주를 배양하고, 그렇으로써 촉적된 아노신 및/또는 구아노신을 생성된 배양 브로스로부터 회수함을 특징으로 하는 이노신 및/또는 구아노신의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따라 사용된 미생물은 성장을 위해 아데닌을 필요로 하여 안티 폴레이트에 저항성을 갖는 바실루스 속의 이노신 및/또는 구아노신 생산 균주이다.

본 발명에 사용된 안티폴레이트(풀산 길항 물질)는 디히드로폴레이트 환원 효소 또는 풀산이 참여하는 일탄소 전이 반응에 길항적 저해 작용을 나타내는 약제이다.

안티 폴레이트로서, 메토트랙세이트, 아미노프테린, 트리 메토프림 또는 피리메타민 등이 있다.

발명에 사용된 변이주는 바실루스 푸밀루스(*Bacillus pumilus*), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실루스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)등의 야생균주 뿐 아니 라 바실루스 속의 이노신 및/또는 구아노신 생산균주[예를들면 일본국 특허 공보 제 46839/1976에 기재된 바실루스 푸밀루스 No. 158-A-11(IF0 12476)]를 포함한 넓은 범위의 모균주로부터 유도될 수 있다.

본 발명에 사용되는 미생물의 유도 및 분리는 공지의 방법에 의해 쉽게 수행될 수 있다. 그러므로 필요한 변이주는 바실루스 속의 미생물, 예를 들면 바실루스 푸밀루스, 바실루스 서브틸리스, 바실루스 리케니포르미스를 자외선 방사, N-메틸-N'-니트로-N-니트로소구아니딘(NTG)처리와 같은 공지의

방법으로 처리한 후, 처리된 미생물을 모균주의 성장을 방해하는 농도의 안티플레이트를 함유한 플레이트 배지에서 배양하고, 생성된 집락을 선택 회수함으로써 수득될 수 있다.

상기 플레이트 배지에서, 안티플레이트의 농도는 모균주의 종류 또는 배지의 조성에 따라 변화된다. 예를들면, 한천을 함유한 하기 배지(A)를 사용한 경우 메토트렉세이트, 아미노프테린, 트리메토프림 또는 피리메타민이 하기와 같은 농도로 가해진다.

메토트렉세이트 : 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 바람직하게는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상

아미노프테린 : 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 바람직하게는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상

트리메토프림 : 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 바람직하게는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상

피리메타민 : 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상, 바람직하게는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상

유도된 변이주의 안티플레이트에 대한 저항 정도는 하기 방법에 의해 측정될 수 있다. 표 1에 기재된 배지(A)에 지정된 농도의 안티플레이트를 가함으로써 제조된 배지(B) 5ml를 함유한 시험관을 영양 한천(Difco)에서 미리 성장된 약 10⁶ 세포/ml의 시험 균주로 접종시키고, 37°C에서 24시간 동안 진탕배양한다. 생성된 브로스를 물로 10배 회석하고 590nm에서 희석 흡광도를 측정하여 성장도(B 590)를 구한다. 풀산이없는 배지(A)에서의 같은 균주의 성장도(B 590)를 100으로 하면, 안티플레이트 함유 배지에서의 상대 성장도는 (B 590/A 590) × 100으로 표시된다.

[표 1]

배지의 조성	농 도
글루코오즈	5.0%
황산 암모늄	0.3%
소듐 글루타메이트	1.0%
α -알라닌	0.5%
황산 마그네슘	0.01%
디포타슘 하이드로겐 포스페이트	0.1%
황산 망간	2mg/l
황산 아연	2mg/l
비오틴	100 $\mu\text{g}/\text{l}$
티아민	100 $\mu\text{g}/\text{l}$
아데노신	200 $\mu\text{g}/\text{l}$
히스티딘	200 $\mu\text{g}/\text{l}$

본 명세서에서 사용된 "저항 균주"라는 용어는 안티플레이트 함유 배지에서 모균주보다 큰 상대 성장도를 갖는 어떤 변이주를 일컫는다. 본 발명의 실시에 사용될 수 있는 변이주의 예로는 바실루스 푸밀루스NA-1101(IF0 14184, FERM P-6639, KAIST 830719-10110), 바실루스 푸밀루스 NA-1102(IF014185, FERM P-6640, KAIST 830719-10210), 바실루스 푸밀루스 NA-1103(IF0 14186, FERM P-6641, KAIST 830719-10310), 바실루스 서브틸리스 NA-6011(IF0 14189, FERM P-6642, KAIST830719-10410) 및 바실루스 서브틸리스 NA-6012(IF0 14190, FERM P-6643, KAIST 830719-10510)가 있다.

상기 IF0번호는 일본국 오오사까시 요도가와구 주소촌마찌 2쪽에 17-85의 인스티튜트 퍼퍼멘테이션, 오오사까(IF0)에 의해 균주에 붙여진 것이다. 상기와 동일한 종류의 균주가 1982년 7월 13일 이래 IF0에 기탁되어 있다.

1982년 7월 12일 일본국 국제 무역 및 공업국의 공업 과학 및 기술 기관, 발효 연구소(FRI)에 FERM P의 기탁 번호로 기탁된 이들 미생물의 직계는 투다페스트 조약하에 기탁되어 하기와 같은 FERM BP 기탁번호로 FRI에 보관되어 있다.

균 주	부다페스트 조약하의 기탁번호
바실루스 푸밀루스 NA-1101	FERM BP-288
바실루스 푸밀루스 NA-1102	FERM BP-289
바실루스 푸밀루스 NA-1103	FERM BP-290
바실루스 서브틸리스 NA-6011	FERM BP-291
바실루스 서브틸리스 NA-6012	FERM BP-292

상기의 NA-1101, NA-1102 및 NA-1103균주는 모균주의 바실루스 푸밀루스 No. 158-A-11균주(IF0 12476)로부터 유도된 것이고, NA-6011 및 NA-6012균주는 모균주인 바실루스 서브틸리스 No. 115(IF0 14187)로부터 유도된 것이다.

이들 변이주의 미생물적인 특성은 각 모균주의 특성과 유사하다. 각 모균주의 이생물적 특성은 하기와 같다.

	바실루스 푸밀루스 No. 158-A-11 (IFO 12476)	바실루스 서브틸리스 No. 115 (IFO 14187)
--	--	--------------------------------------

a. 형태

1) 모양 및 크기	막대형 $0.6 \times 3\mu$	막대형 $0.3 \times 3\mu$
2) 다형	단형 또는 드물게는 사슬형	단형 또는 드물게 쌍형
3) 운동성	움직이지 못함	움직이지 못함
4) 포자형성	있음	있음
포자의 모양	타원형	타원형
팽창 포자낭	없음	없음
포자의 위치	중앙 또는 중앙 근처	중앙 또는 중앙 근처
5) 그림의 착색	양성	양성
6) 산 저항성	음성	음성

b. 배양특성

1) 부연 한천 플레이트	원형 또는 화상, 불록형, 렌즈, 확산된 무정형, 거친 표면, 불투명, 백색 내지 연황색	불투명, 백색 내지 연갈색
---------------	---	----------------

2) 부연 한천 경사	상향 불록형, 불투명, 백색 내지 연황색	평평형, 불투명, 백색 내지 연갈색
3) 부연 액체	점착성 박막, 비흔탁, 약간의 성장으로 표면 성장됨	점착성 박막, 비흔탁
4) 리트머스 밀크	알칼리성, 펩톤화, 환원	알칼리성, 펩톤화, 환원

C. 생리적 특성

1) 나이트 레이트의 환원	음성	양성
2) V-P 반응	양성	양성
3) 녹말의 가수분해	음성	양성
4) 시트레이트의 이용	양성	양성
5) 프로피오네이트의 이용	음성	음성
6) 암모늄염의 이용	양성	양성
7) 우레아제	약한 양성	약한 양성
8) 카탈라아제	양성	양성
9) 산소의 필요	호기성, 무공기 상태에서 성장 못함	호기성, 무공기 상태에서 성장 못함
10) 7% 염화나트륨에서의 성장	양성	양성
11) pH 5.7 배지에서의 성장	양성	양성
12) 비오틴 필요	양성	음성

IFO 12476 및 IFO 14187균주의 상기 특성을 버기'즈 매뉴얼 어브 디터미네이티브 박테리오로지, 알. 이.부카난 및 엔. 이. 기본즈(ed), 8판 1974와 비교하면 이들 균주가 바실루스 푸밀루스 및 바실루스 서브틸리스에 속함을 알 수 있다.

이노신 및/또는 구아노신의 생산을 위한 이노신 및/또는 구아노신 생산 균주 배양용으로 사용되는 배지는 이노신 및/또는 구아노신 발효에 일반적으로 사용되는 어떤 배지도 가능하다. 배지의 조성에 있어, 탄소원은 글루코오즈, 말토오즈, 녹말 가수분해물 등과 같은 당, 글리세린, 에탄올, 소르비톨 등과 같은 모노히드릭 또는 폴리히드릭 알콜, 및 아세트산, 프로피온산, 스테아르산, 올레산 등과 같은 지방산일 수 있으며, 이들 탄소원은 단독으로 또는 배합되어 사용될 수 있다. 질소원은 펩톤, 대두 가루, 옥수수 침지액, 이스트, 육류 추출물, 우레아등과 같은 유기 질소원, 황산, 질산, 염산, 탄산 등의 암모늄염 및 암모니아 기체, 암모니아수 등과 같은 무기 질소원일 수 있으며, 이들 질소원은 단독으로 또는 배합되어 사용될 수 있다. 기타 영양원으로서, 칼슘, 포타슘, 소듐, 마그네슘, 망간, 철, 구리, 아연 등의 황산염, 염산염, 탄산염, 질산염, 인산염, 아세트산염 등과 같은 균주의 성장에 필요한 각종 무기염 및 생물체의 성장에 필요한 아미노산, 비타민등이 있다. 이들 영양원은 단독으로 또는 배합되어 사용될 수 있다. 아데닌 원으로서, 아데닌, 아데노신, 아데닐산, 리보핵산 뿐만 아니라 이들, 이들의 추출물, 육류 추출물 등을 함유한 미생물 세포와같은 천연 물질이 사용될 수 있다. 더우기, 거품 제거제 및 실리콘유, 폴리알킬렌 글리콜 에테르 등과 같은 표면 활성제가 필요시 배지에 배합될 수 있다.

배양은 일반적으로 통기 상태에서, 예를들면 진탕 배양에 의해 또는 통기 배양에 의해 수행될 수 있다. 배지는 바람직하게는 pH 4~pH 9의 범위에서 유지된다. 발효하는 동안 pH의 변화가 생기면 때때로 알칼리 수산화물, 탄산칼슘, 암모니아 등의 수용액 또는 혼탁액 또는 암모니아 기체를 가하여 조정한다. 배양온도는 일반적으로 20.~45°C의 범위이며, 미생물의 성장 및 이노신 및/또는 구아노신의 축적을 위한 최적온도가 선택된다. 이노신 및/또는 구아노신의 축적이 최대치에 도달할 때까지 배양을 계속하며, 일반적으로는 24~144시간 동안 수행한다.

발효 브로스로부터의 이노신 및/또는 구아노신의 분리 및 회수는 침전, 이온 교환 수지 또는 활성탄

크로마트그래피 등과 같은 공지의 방법에 의해 수행될 수 있다.

본 발명에 따라, 이노신 및/또는 구아노신은 공지의 방법과 비교해 상당히 높은 수율로 제조될 수 있다. 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[실시예 1]

바실루스 푸밀루스 No. 158-A-11(IFO 12476) [유전형질 : 아데닌 필요, 아데닌/구아노신 저항성, 구아닐산 환원 효소 결핍, 및 히스티딘 필요]를 공지 방법에 의해 니트로소구아니딘(NTG)으로 처리하고, 표1의 배지 A에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 메토트랙세이트 및 25g/l의 한천을 가함으로써 제조된 플레이트에 화선(畫線)한다. 접종된 배지를 37°C에서 3일간 배양하고, 접락으로부터 바실루스 푸밀루스 NA-1101(IF0 14184, FERM BP-288, KAIST 830719-10110)을 선택한다. 생성된 균주와 모균주의 메토트랙세이트에 대한 저항성(상대 성강도)을 상술한 방법에 의해 측정한다. 결과는 표 2에 나타낸다.

[표 2]

균 주	상대 성장도					
	가해진 메토트랙세이트 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	0	1	2	4	8	15
NA-1101	100	100	100	100	100	88
No. 158-A-11	100	80	65	43	40	18

그리고, 표 3의 종배양 배지 20ml가 담겨진 200ml들이 원추 플라스크를 영양 한천(Difco) 플레이트에서 성장된 1루우프의 바실루스 푸밀루스 NA-1101로 접종시키고, 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양 한다. 배양액의 일부(1ml)를 표 3에 기재된 주 발효 배지 20ml가 담겨진 200ml들이 주를형 플라스크로 옮기고 37°C에서 회전 교반기로 4시간 동안 배양한다. 구아노신의 수율은 23.0mg/ml이다.

[표 3]

종 배 양		주 발효 배지	
배지의 조성	농 도	배지의 조성	농 도
소르비톨	2.0%	글루코오즈	15.0 %
전조된 이스트	1.5%	황산 암모늄	2.0 %
포타슘 디하이드로겐 포스페이트	0.1%	우레아	1.0 %
디포타슘 하이드로겐 포스페이트	0.3%	소듐 글루타메이트	1.0 %
히스티딘	0.01%	옥수수 침지액	2.0 %
		조 혜산	0.2 %
		염화 칼슘	0.5 %
		황산 마그네슘	0.2 %
		염화 칼륨	0.05 %
		탄산 칼슘	3.0 %
		비오틴	200 $\mu\text{g}/\text{l}$
		황산 망간	2.5mg/l

총 약 50플라스크에 대해 상기 과정을 수행하여 11의 브로스를 수득한다. 이 브로스를 수산화나트륨에 의해 pH 11로 맞추고, 구아노신 결정을 용해시킨 후, 원심 분리하여 세포를 제거한다. 수득된 상

총액을 중화하고 냉각시켜 21.0g의 구아노신 조결정을 수득한다. 이 결정을 900ml의 열수에 용해시 키고, 활성탄으로 탈색한 후, 냉각하 방치하여 구아노실을 침전시킨다. 18.4g의 구아노신 순수 결정을 수득한다. 같은 조건하 모 균주 No.158-A-11을 배양하면 단지 4.5mg/ml 수율의 구아노신 축적이 관찰된다.

[실시예 2]

바실루스 푸밀루스 No.158-A-11을 공지의 방법으로 자외선 방사 및 NTG처리하고, 실시예 1과 마찬가지로 배지 A에 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아미노-프테린 및 25g//의 한천을 가함으로써 제조된 플레이트배지에 화선배양하여 바실루스 푸밀루스 NA-1102(IF0 14185, FERM BP-289, KAIST 830719-10210)의 집락을 선택한다. 이 균주를 실시예 1과 같은 조건에서 배양한다. 브로스에서 이노신 및 구아노신의 수율은 각각 18mg/ml 및 6mg/ml이다.

[실시예 3]

바실루스 서브틸리스 No.115(야생균주)(IF0 14187)을 공지의 NTG처리하여 아데닌 필요 변이주 NA-6001(IF0 14188)을 수득한다. 이 균주를 NTG로 세번 더 처리하여 바실루스 서브틸리스 NA-6011(IF014189, FERM BP-291, KAIST 830719-10410)을 수득한 후, 이 균주를 배지 A에 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아미노프데린 및 25g/1의 한천을 가함으로써 제조된 플레이트 배지에서 성장시킨다. 이들 각 균주의 아미노프데린 저항성 및 이노신/구아노신 생산 능력을 실시예 1의 방법에 의해 측정한다. 결과는 각각 표 4 및 표 5에 기재되어 있다.

[표 4]

균 주	상대 성장도					
	가해진 아미노프데린 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
	0	4	8	15	30	60
NA-6011	100	100	97	95	89	52
NA-6001	100	85	75	55	22	13

[표 5]

균 주	상대 성장도	
	이노신의 축적	구아노신의 축적
NA-6011	18mg/ml	5mg/ml
NA-6001	1	-

[실시예 4]

바실루스 푸밀루스 No.158-A-11을 공지 NTG처리하여 바실루스 푸밀루스 NA-1103(IF0 14186, FERM BP-290, KAIST 830719-10310)를 수득하고, 이 변이주를 배지 A에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 트리메트프링 및 25g/1의 한천을 가함으로써 제조된 플레이트 배지에 성장시킨다. 이 균주의 트리메토프림 저항성은 표 6에 기재되어 있다.

[표 6]

균 주	상대 성장도				
	가해진 트리메토프링 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	0	0.1	0.25	0.5	1.0
NA-1103	100	100	100	100	89
NA-158-A-11	100	36	17	10	7

이 균주를 실시예 1과 같은 조건에서 배양하였을 때 22mg/ml의 비율로 구아노신이 축적된다.

[실시예 5]

바실루스 서브틸리스 NA-6001(IF0 14188)을 NTG로 네번 처리하여 바실루스 서브틸리스 NA6012(IF0 14190, FERM BP-292, KAIST 830719-10510)를 수득하고, 이 변이주를 배지 A에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 피리메타

민 및 25g//의 한천을 가함으로써 제조된 블레이트 배지에 성장시킨다. 이 변이주의 피리메타민 저항성은 표 7에 기재되어 있다.

[표 7]

균 주	상대 성장도							
	피리메타민 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)							
	0	0.5	1.5	3.0	6.0	12	25	50
NA-6012	100	100	86	76	66	52	49	26
NA-6001	100	85	56	26	6	2	2	2

이 변이주가 실시예 1과 같은 조건에서 배양되었을 때 각각 9mg/ml 및 14mg/ml의 이노실 및 구아노신의 촉적된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

성장을 위해 아데닌을 필요로 하고, 안티플레이트에 저항성을 가지며, 이노신, 구아노신, 또는 그의 혼합물을 생산할 수 있는 바실루스 서브틸리스종의 변이주를 배지에서 배양함으로써 상기 균주를 성장시켜, 배양브로스에 이노신, 구아노신, 또는 그의 혼합물을 촉적시키고, 촉적된 이노신, 구아노신 또는 그의 혼합물을 상기 브로스로부터 회수함을 특징으로 하는 이노신, 구아노신 또는 그의 혼합물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 변이주가 메토트렉세이트에 저항함을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 변이주가 아미노프테린에 저항함을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 변이주가 피리페타민에 저항함을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 변이주가 트리메토프림에 저항함을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 변이주가 바실루스 서브틸리스 NA-6011(FERM BP-291, KAIST 830719-10410) 또는 바실루스 서브틸리스 NA-6012(FERM BP-292, KAIST 830719-10510)임을 특징으로 하는방법.