



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월26일
(11) 등록번호 10-2169686
(24) 등록일자 2020년10월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/48 (2006.01) C12N 1/14 (2018.01)
C12R 1/665 (2006.01) C12R 1/685 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-0117302
- (22) 출원일자 2014년09월03일
심사청구일자 2018년09월27일
- (65) 공개번호 10-2016-0028314
- (43) 공개일자 2016년03월11일
- (56) 선행기술조사문헌
Appl Microbiol., 1953 Jan, Vol. 1, No. 1, pp. 7-13*
Bioresource Technology, 2000, Vol. 74, pp. 175-178*
J Food Sci Technol, 2010, Vol. 47, No. 4, pp. 458-460
Brazilian Journal of Microbiology, 2010, Vol. 41, pp. 862-875
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
- (72) 발명자
최신식
경기도 용인시 기흥구 동백2로 37 어은목 대원칸타빌 4103동 2104호
황 티옥 메이
경기도 용인시 처인구 명지로 116 차세대과학관 23435호 (남동, 명지대학교용인캠퍼스)
양희진
경기도 수원시 권선구 정조로 388번길 14, 가동 305호
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 1 항

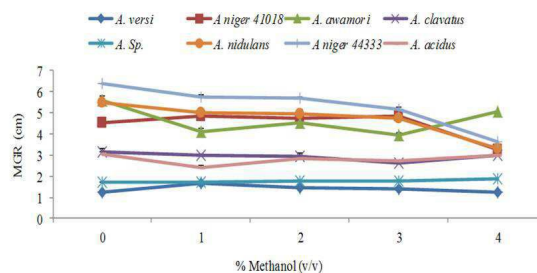
심사관 : 류민정

(54) 발명의 명칭 메탄올에 의해 변이된 아스퍼질러스 속 미생물을 이용한 시트르산의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 아스퍼질러스(Aspergillus) 속 미생물을 이용한 시트르산의 제조방법, 시트르산 생산을 위한 변이된 미생물의 제조방법, 이를 통해 변이된 아스퍼질러스 속 미생물에 관한 것으로, 메탄올에 적응하여 변이된 아스퍼질러스 속 미생물은 고농도의 메탄올을 환경에서 시트르산의 생산능을 현저히 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711093412
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	메탄올 이용 생물학적 전환을 통한 고부가 화합물 생산 공정 개발
기여율	1/1
과제수행기관명	명지대학교
연구기간	2019.04.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

기탁번호 KACC93201P로 기탁된, 아스퍼질러스 나이저 44333(*Aspergillus niger* 44333).

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 시트르산 생산을 위한 변이된 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속 미생물, 그의 제조방법, 및 이를 이용한 시트르산의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 시트르산은 레몬과 귤 등 많은 식물의 열매와 씨 등에 함유되어 있는 유기산으로 구연산이라고도 불린다. 시트르산은 생체 내에서 탄수화물, 단백질, 지방을 분해하여 에너지를 얻는 과정에 속하는 TCA 회로 (Tricarboxylic Acid Cycle)에서 중간물질이기 때문에 체내에서 중요한 역할을 한다. 또한 시트르산은 여러 산업분야에서 많이 사용되며 특히 식품산업에서는 음식의 맛 또는 신맛을 내는 산미제와 천연 방부제 등으로 널리 사용되고 있다.

[0003] 이에 따라 시트르산에 대한 수요가 전 세계적으로 높아지면서 시트르산의 생산량을 증가시키기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 가장 대표적인 방법으로는 곰팡이를 이용하여 탄수화물을 발효시킴으로써 시트르산을 얻는 방법이 있는데, 특히 시트르산을 배지에 배출시킬 수 있는 아스퍼질러스 나이저(*Aspergillus niger*) 곰팡이가 연구에 다수 사용되고 있다.

[0004] 시트르산의 생산량을 증가시키기 위한 또 다른 방법으로, 메탄올을 아스퍼질러스 나이저가 성장하는 액체 배지에 첨가하여 배양하였을 경우, 메탄올을 함유하지 않은 배지에서 배양한 것에 비해 시트르산이 더 많이 생산된다고 보고된 바 있다(Wieczorek and Braver, 1998, I.-U. Haq et al. Bioresource Technology, 2003). 이는 메탄올이 아스퍼질러스 나이저의 세포막의 삼투압을 증가시키고 균사체의 형태, 펠렛의 형태 및 크기를 변형시켜 균사체로부터 시트르산의 배출을 용이하게 할 뿐만 아니라, 시트르산을 생성하는 효소인 시트레이트 신타아제 (citrate synthase)의 활성을 높여 시트르산 생성을 촉진시키기 때문인 것으로 보인다(I.-U. Haq et al. Bioresource Technology, 2003, Srivasta and Kamal, 1979).

[0005] 그러나 시트르산 생성을 위한 미생물의 발효에 있어 pH 값을 유지하는 것은 필수적이며, 메탄올은 독성이 있으므로, 메탄올을 시트르산 생산의 촉진제로 사용할 경우 메탄올의 농도가 증가함에 따라 오히려 미생물의 증식이 저해되는 문제가 있다. I.-U. Haq 외(2003)는 아스퍼질러스 나이저에 1.0%(v/v) 메탄올을 처리할 경우 메탄올을 처리하지 않은 대조군에 비하여 무수 시트르산의 생산량이 약 2배 향상되었으나, 메탄올의 농도가 1.0%(v/v)를 넘을 경우 오히려 시트르산의 생산이 급격히 감소하였다고 보고한 바 있다. 또한, 미국등록특허 제4,791,058호는 아스퍼질러스 나이저에 3 %(v/v)이상의 메탄올을 처리할 경우 시트르산의 수율이 급격히 줄어든다고 기재하고 있다.

[0006] 따라서 종래 연구에서는 1.0%(v/v) 내외의 농도의 메탄올을 처리할 경우 시트르산의 수율이 가장 높은 것으로 나타났으나 그 처리 농도를 높임에 따라 오히려 미생물의 증식이 억제되었다. 나아가, 같은 종이라 하더라도 메탄올 처리 하에서 일관되게 시트르산의 생산량이 증가되지 않는 한계가 있었다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 아스퍼질러스 속 미생물을 이용하여 시트르산의 생산을 증가시키기 위한 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 아스퍼질러스 속 미생물을 고농도의 메탄올에 적응시켜 변이시킬 경우 (beneficial mutation) 시트르산의 생산율이 현저히 향상되며 이러한 경향이 유지됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 아스퍼질러스 속 미생물의 포자를 1%(v/v) 내지 8%(v/v)의 메탄올을 포함하는 배

지에서 배양하여, 메탄올에 의해 변이된 미생물을 제조하는 제1단계; (b) 상기 제1단계에서 변이된 미생물의 포자를 분리하는 제2단계; (c) 상기 제2단계에서 분리된 포자를 0.01%(v/v) 내지 8%(v/v)의 메탄올을 포함하는 배지에서 배양하는 제3단계; 및 (d) 상기 제3단계에서 배양된 미생물 또는 그의 배지로부터 시트르산을 수득하는 제4단계를 포함하는, 시트르산의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 아스퍼질러스 속 미생물의 포자를 1%(v/v) 내지 8%(v/v)의 메탄올을 포함하는 배지에서 배양하는 제1단계; 및 상기 배양된 미생물 중 정면은 노란색, 배면은 흰색을 나타내는 균사체의 포자를 분리하는 제2단계를 포함하는, 시트르산 생산을 위한 변이된 미생물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 제조방법에 의해 제조된, 변이된 아스퍼질러스 속 미생물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 아스퍼질러스 속 미생물의 포자를 1%(v/v) 내지 8%(v/v)의 메탄올을 포함하는 배지에서 배양하는 제1단계; 및 상기 배양된 미생물 중 정면은 노란색, 배면은 흰색을 나타내는 균사체의 포자를 분리하는 제2단계를 포함하는, 시트르산 생산을 위한 변이된 미생물의 제조방법, 및 상기 제조방법에 의해 제조된, 변이된 아스퍼질러스 속 미생물을 제공한다.

[0012] 도 1에 도시된 것과 같이 메탄올 환경에서 배양할 경우 아스퍼질러스 속 미생물의 증식은 다소 저해되며, 이에 따라 시트르산의 생산량이 낮아지거나, 균일한 생산량을 예측하기 어렵다. 이에 본 발명자들은 아스퍼질러스 속 미생물의 포자를 고농도의 메탄올을 포함하는 배지에서 배양하였을 때, 메탄올을 포함하지 않는 배지에서 배양한 미생물과 상이한 색과 모양을 나타내는 균사체가 나타나며, 이러한 균사체를 갖는 미생물의 포자를 분리하여 다시 메탄올을 포함하는 배지에서 배양한 결과, 시트르산의 생산량이 증가되는 결과를 계속해서 보임을 확인하였다(실험예 3, 도 4 및 도 5). 즉, 1차적으로 고농도에 메탄올에 적응하여 변이된 아스퍼질러스 속 미생물은, 이후에 저농도의 메탄올을 포함하는 배지에서 배양하더라도 일정하게 시트르산의 생산량을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0013] 본 발명의 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속에 속하는 미생물은 곰팡이균의 일종으로서, 본 발명에서 곰팡이와 동일한 용어로 사용될 수 있다.

[0014] 일 예로 아스퍼질러스 애시더스(*A. acidus*), 아스퍼질러스 아와모리(*A. awamori*), 아스퍼질러스 클라바투스(*A. clavatus*), 아스퍼질러스 니둘란스(*A. nidulans*), 아스퍼질러스 나이저(*A. niger*), 아스퍼질러스 베르시콜코르(*A. versicolor* Vuill.)를 포함할 수 있으나, 본 발명의 목적인 시트르산을 생산할 수 있는 한 이에 제한되지 않는다. 다른 일 예로 상기 아스퍼질러스 미생물은 아스퍼질러스 애시더스 코작(*A. acidus* Kozak 41731), 아스퍼질러스 아와모리 나카즈 41844(*A. awamori* Nakaz 41844), 아스퍼질러스 클라바투스 데마지에르 40071(*A. clavatus* Desmazieres 40071), 아스퍼질러스 니둘란스 44342(*A. nidulans* (Ediam) G. Winter 44342), 아스퍼질러스 나이저 반 테이검 41018(*Aspergillus niger* van Tieghem 41018), 아스퍼질러스 나이저 반 테이검 44333(*Aspergillus niger* van Tieghem 44333), 아스퍼질러스 베르시콜코르 42602(*A. versicolor* (Vuill.) Tirab. 42602)를 포함할 수 있다.

[0015] 이하, 상기 변이된 아스퍼질러스 속 미생물의 제조방법을 각 단계별로 설명한다.

[0016] 먼저, 제1단계에서는 아스퍼질러스 속 미생물의 포자를 메탄올을 포함하는 배지에 접종하여 배양한다.

[0017] 메탄올은 아스퍼질러스 속 미생물의 시트르산 생산을 향상시키는 촉진제로 알려져 있으나, 아스퍼질러스 속 미생물의 종에 따라 1%(v/v) 또는 3%(v/v) 이상의 농도의 메탄올 환경에서 배양할 경우 낮은 pH와 독성으로 인하여 증식율이 저하되며, 이에 따라 시트르산의 생산량이 줄어드는 문제가 있다. 나아가 메탄올을 일회성으로 배지에 첨가하는 방법과 달리, 메탄올에 미생물을 지속적으로 노출시켜 변이시키는 방법 및 그의 효과에 대해서는 전혀 알려진바 없다. 이에 본 발명자들은 고농도의 메탄올에 아스퍼질러스 속 미생물을 노출시킴으로써, 메탄올에 의해 변이된 미생물로서 시트르산의 생산량이 증가된 변이체를 최초로 제작하였다.

- [0018] 상기 메탄올은 일 예로 1%(v/v) 내지 8%(v/v)의 농도인 것일 수 있으며, 다른 일 예로 4%(v/v) 내지 8%(v/v)의 농도인 것일 수 있다. 1%(v/v) 미만의 농도에서는 메탄올에 대한 적응이 충분히 일어나지 않을 수 있으며, 8%(v/v) 초과 농도에서는 메탄올로 인한 pH 저하 및 독성으로 인하여 곰팡이 생장이 저하될 수 있다.
- [0019] 상기 포자는 아스퍼질러스 속 미생물의 생식세포로, 본 발명에서 분생포자(conidia)와 동일한 의미로 사용될 수 있다. 상기 포자의 접종은 당업계에서 아스퍼질러스 속 미생물의 포자를 배지에 배양시키기 위하여 사용하는 방법이라면 제한되지 않고 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 용어, "배양"은 미생물을 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다. 본 발명의 배양을 위한 배지는 본 발명의 목적인 시트르산 생산이 가능하다면 당업계에서 아스퍼질러스 속 미생물에 사용하는 배지를 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0021] 상기 배지는 일 예로 고체 배지일 수 있다. 고체 배지는 발효 시 사용되는 기질이 함유된 배지의 상태가 액체가 아닌 고체인 것을 말한다. 고체 배지를 사용하여 고체 상태로 발효할 경우, 수중 발효(SmF)보다 에너지 요구량이 낮고 폐수가 적기 때문에 대량의 화학물질 생산에 유리하다.
- [0022] 다음, 제2단계에서는 상기 제1단계에서 배양된 미생물 중 정면은 노란색, 배면은 흰색을 나타내는 균사체의 포자를 분리한다. 상기 정면은 포자를 접종시킨 방향의 면을 말하며, 배면은 정면의 반대 방향의 면을 말한다.
- [0023] 본 발명자들은 고농도의 메탄올을 포함하는 배지에서 아스퍼질러스 속 미생물을 배양한 결과 정면은 노란색, 배면은 흰색을 나타내는 균사체를 얻었다(도 2). 상기 미생물의 포자를 분리하여 다시 메탄올을 포함하는 배지에서 배양한 결과, 미생물에서 생산되는 시트르산의 양이 현저히 증가하였으며, 이러한 경향은 계대배양 시 계속 유지되었음을 확인하였는데, 상기 메탄올을 포함하지 않는 배지에서 배양된 미생물과 상이한 색과 크기로 배양된 미생물은, 메탄올에 의해 변이(beneficial mutation)된 것임을 확인하였다(실험예 2 및 3). 따라서 상기 정면은 노란색, 배면은 흰색을 나타내는 균사체를 갖는 미생물은 메탄올에 적응하여 변이된 미생물을 의미한다.
- [0024] 상기 균사체(mycelium)는 곰팡이의 영양세포인 균사가 집단을 이룬 것으로, 곰팡이에서 균사체는 여러 갈래로 분지하여 실처럼 엉겨 있다.
- [0025] 상기 포자의 분리 방법은 당업계에서 곰팡이의 포자를 분리하는 방법이라면 제한되지 않고 사용할 수 있다.
- [0026] 한편, 메탄올을 포함하지 않는 배지에서 배양된 곰팡이는 균사체의 배면이 흰색, 정면이 검은색으로 나타나므로, 메탄올에 의해 변이된 미생물은 도 2와 같이 육안으로도 구분할 수 있다.
- [0027] 상기 제2단계 이후, 분리된 변이된 미생물의 포자를, 메탄올을 포함하는 배지에 접종하고 배양하여 시트르산의 생산 여부를 확인하는 제3단계; 및 메탄올을 포함하지 않는 배지에서 배양된 미생물에 비하여 시트르산의 생산이 증가된 미생물을 변이된 미생물로 결정하는 제4단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명자들은 아스퍼질러스 속 미생물을 고농도에서 적응시킬 경우 적어도 2번째 계대배양 이후부터는 증식율이 저하되지 않으며 메탄올 환경에서도 최대 2.4배의 높은 시트르산 생산량을 나타냄을 확인하였다(실험예 3, 도 4 및 도 5). 이에 메탄올에 의하여 변이된 아스퍼질러스 나이지 44333(*Aspergillus niger* 44333)를 기탁번호 KACC93201P로 기탁하였다(2014년 5월 30일).
- [0029] 상기 제1단계 또는 제3단계는 미생물 배양 시 자외선을 조사하는 것일 수 있다. 자외선 조사(UV irradiation)는 배양되는 미생물을 자극하여 장기간 적응력을 키우기 위한 것이다.
- [0030] 본 발명자들은 배양 시 자외선을 조사할 경우, 메탄올에 적응하여 변이된 아스퍼질러스 속 미생물의 균사체 크기가 증가하였으며, 장기 적응력이 향상되는 효과가 있음을 확인하였다.
- [0031] 자외선 조사는 당업계에서 미생물에 자외선을 조사하는 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들어 20 내지 60와트의 UV 램프로 5분 내지 20분 동안 조사하는 방법을 사용할 수 있다. 과도한 양의 자외선을 장시간 동안 조사할 경우 오히려 미생물의 증식을 저해할 수 있다.

- [0032] 상기 제조방법에 의하여 제조된 변이된 미생물은 0.1 내지 8%(v/v)의 메탄올을 포함하는 배지에서 시트르산을 생산하는 것일 수 있다. 시트르산의 생산 시에는 미생물에 변이에 필요한 메탄올의 농도보다 낮은 농도의 메탄올을 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 제조방법에 의하여 제조된 변이된 미생물을 제공한다. 상기 미생물은 기탁 번호 KACC93201P의 아스퍼질러스 나이저44333(*aspergillus niger* 44333)인 것일 수 있으며, 이는 상기한 것과 같다.
- [0034] 본 발명은 또 하나의 양태로서, 상기 제조방법에 의하여 제조한, 변이된 아스퍼질러스 속 미생물을 이용한 시트르산의 제조방법을 제공한다.
- [0035] 상기 시트르산의 제조방법은 (a) 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속 미생물의 포자를 메탄올을 포함하는 배지에서 배양하여, 메탄올에 의해 변이된 미생물을 제조하는 제1단계; (b) 상기 제1단계에서 변이된 미생물의 포자를 분리하는 제2단계; (c) 상기 제2단계에서 분리된 포자를 0.01%(v/v) 내지 8%(v/v)의 메탄올을 포함하는 배지에서 배양하는 제3단계; 및 (d) 상기 제3단계에서 배양된 미생물 또는 그의 배지로부터 시트르산을 수득하는 제4단계를 포함한다.
- [0036] 상기 제1단계에 의해 변이된 미생물은 메탄올을 포함하지 않는 배지에서 배양된 미생물과 상이한 색과 크기로 배양된 것일 수 있으며, 이는 상기한 것과 같다. 일 예로 균사체의 정면은 노란색, 배면은 흰색을 나타내는 것일 수 있다(도 2).
- [0037] 상기 제1단계에서 사용되는 배지는 1%(v/v) 내지 8%(v/v), 일 예로 4%(v/v) 내지 8%(v/v)의 메탄올을 포함하는 것일 수 있다. 메탄올에 대한 것은 상기한 것과 같다.
- [0038] 상기 제2단계에서 포자를 분리하는 방법은 당업계에서 곰팡이의 포자를 분리하는 방법이라면 제한되지 않고 사용할 수 있으며, 상기한 것과 같다.
- [0039] 상기 제3단계에서 사용되는 배지는 0.1%(v/v) 내지 4%(v/v)의 메탄올을 포함하는 것일 수 있다. 메탄올에 적응하여 변이된 아스퍼질러스 속 미생물은, 농도 0.1%(v/v) 이상의 메탄올 환경에서 시트르산의 생산량이 매우 증가하였다.
- [0040] 상기 배지는 일 예로 고체 배지일 수 있으며, 이는 상기한 것과 같다.
- [0041] 상기 제3단계는 일 예로 2번 이상 반복되는 것일 수 있다. 본 발명자들은 메탄올에 의해 무작위적 변이가 일어난 아스퍼질러스 속 미생물을 1회 배양할 경우(도 3의 w2)에 비하여 2번 이상 계대배양할 경우(도 3의 w3), 증식율이 저하되지 않으며 메탄올 환경에서도 최대 2.4배의 높은 시트르산 생산량을 나타내어 시트르산 생산능이 증가함을 확인하였다.
- [0042] 제1단계의 배지는 일 예로 제3단계의 배지에 비해 높은 농도의 메탄올을 포함하는 것일 수 있다. 제3단계에서 시트르산의 생산을 위해 사용하는 메탄올 농도는, 미생물의 변이에 필요한 메탄올 농도에 비하여 낮은 농도인 것이 바람직하다.
- [0043] 상기 제1단계 또는 제3단계는 미생물 배양 시 자외선을 조사할 수 있다. 자외선 조사(UV irradiation)는 배양되는 미생물을 자극하여 장기간 적응력을 키우기 위한 것이다. 배양 시 자외선을 조사할 경우, 메탄올에 대한 아스퍼질러스 속 미생물의 장기 적응력이 높아질 수 있다.

[0044] 제4단계의 시트르산의 수득 방법은 당업계에서 곰팡이에서 생산된 시트르산을 수득하기 위하여 사용하는 방법을 제한 없이 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0045] 본 발명에 따른 메탄올에 적응하여 변이된 아스퍼질러스 속 미생물은 고농도의 메탄올 환경에서도 일정하게 시트르산의 생산능을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 메탄올의 처리 농도에 따른 아스퍼질러스 속 미생물의 균사체 지름(MGR)을 나타낸 것이다.
 도 2는 본 발명에 따라 메탄올에 적응하여 변이된 아스퍼질러스 속 미생물의 균사체 및 포자가 배양된 배지의 정면(오른쪽) 및 배면(왼쪽)을 나타낸 것이다.
 도 3은 본 발명에 따라 변이된 아스퍼질러스 속 미생물의 계대배양 주(week; w)수에 따른 균사의 상대 지름(relative MGR)을 나타낸 것이다.
 도 4는 아스퍼질러스 속 미생물의 변이 유무에 따른 시트르산 생산 정도를 브로모크레솔 그린에 의하여 나타낸 것이다.
 도 5는 본 발명에 따라 제조된 변이된 아스퍼질러스 속 미생물에서 생산된 시트르산의 양을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0048] 실시예 1. 메탄올이 함유된 고체 배지 제조

[0049] 삼각 플라스크 용기에 증류수 1L와 PDA(Potato Dextrose Agar, Difco) 39g을 섞어 PDA 배지를 제조한 후 121℃에서 15분 동안 고압증기멸균기로 멸균하였다. 45℃로 배지의 온도를 내린 다음, 10% 타르타르산을 첨가하고 pH를 3.5로 조정하여 다른 미생물에 의한 오염을 방지하였다. 그 후, 배지의 온도를 30℃로 맞추고 상기 PDA 배지 500mL에 메탄올 26.32mL를 첨가하여 5%(v/v) 농도가 배지를 제조하였다. 동일한 방법으로 메탄올을 1, 2, 3, 4%(v/v) 포함하는 배지를 제조하고 페트리접시에 부어 고체 배지를 제조하였다.

[0050] 실험예 1. 메탄올 환경에서 곰팡이 배양

[0051] 8종의 아스퍼질러스 곰팡이로, 농촌진흥청 미생물은행(KACC)에서 분양받은 아스퍼질러스 에시더스 코작, 아스퍼질러스 아와모리 나카즈 41844, 아스퍼질러스 클라바투스 데마지에르 40071, 아스퍼질러스 니들란스(에디암) G.윈터 44342, 아스퍼질러스 나이저 반 데이검 41018, 아스퍼질러스 나이저 반 데이검 44333, 아스퍼질러스 베르시콜코르(부일) 티랍. 42602, A.sp 를 준비하였다.

[0052] 각 미생물 종의 포자 용액 100 μ l(약 2.5 x 10⁴포자) 각각을 실시예 1에서 제조한 0, 1, 2, 3, 4%(v/v) 농도의 메탄올을 포함하는 고체 배지의 중앙에 접종하였다. 그 후, 34℃의 배양기에서 5일 동안 배양하며 균사체의 지름(MGR)을 측정하여 도 1에 나타내었다.

[0053] 그 결과, 아스퍼질러스 클라바투스 데마지에르 40071(*A. clavatus*)는 메탄올 처리에도 불구하고 균사체 크기가 일정하게 나타났다. 그러나, 아스퍼질러스 에시더스 코작(*A. acidus*)과 아스퍼질러스 아와모리(*A. awamori*)는 1%(v/v) 농도 이상의 메탄올을 처리할 경우 균사체의 증식이 감소하였으며, 아스퍼질러스 베르시콜코르(부일) 티랍. 42602(*A. versicolor*)는 낮은 농도의 메탄올을 처리할 경우 균사체의 지름이 증가하였으나, 2%(v/v) 이상의 메탄올 농도에서는 균사체의 증식이 다시 감소하였다. 또한, 아스퍼질러스 나이저 반 테이검 44333(*A. niger* 44333), 아스퍼질러스 나이저 반 테이검 41018(*A. niger* 41018), 아스퍼질러스 니들란스(*A. nidulans*)의 경우 메탄올 처리에 따라 균사체의 증식이 저해되었다.

[0054] 따라서, 메탄올을 처리할 경우 아스퍼질러스 속 미생물의 증식이 다소 저해되며, 이에 따라 시트르산 생산량을 균일하게 얻기 어려운 문제가 있다.

[0055] **실험예 2. 변이된 아스퍼질러스 속 미생물의 제조**

[0056] 실험예 1에서 균사체의 지름이 가장 크게 나타난 아스퍼질러스 속 미생물인 아스퍼질러스 아와모리 나카즈 41844, 아스퍼질러스 나이저 반 테이검 41018, 아스퍼질러스 나이저 반 테이검 44333의 포자 용액 100 μ l(약 2.5 x 10⁴포자) 각각을 실시예 1에서 제조한 5%(v/v) 농도의 메탄올을 포함하는 고체 배지의 중앙에 접종하고, 34 $^{\circ}$ C의 배양기에서 1주 동안 배양하였다.

[0057] 도 2는 아스퍼질러스 나이저 반 테이검 44333(*A. niger* 44333)을 고농도(5%v/v)의 메탄올에서 배양한 첫 주(w 1)의 형태를 나타낸 것으로, 균사체(mycelium)의 배면(왼쪽)이 흰색으로, 정면(오른쪽)이 노란색으로 나타났다. 이는 메탄올을 포함하지 않은 배지에서 배양된 곰팡이는 균사체의 배면이 흰색, 정면이 검은색으로 나타나는 것과 상이한 색과 형태를 나타낸 것이다. 한편 도 2의 검정색은 포자(conidia)를 나타낸다.

[0058] 도 2와 같이 메탄올을 포함하지 않은 배지에서 배양된 곰팡이와 상이한 색과 형태를 나타내는 균사체의 포자(도 2의 검은색 부분)를 분리하여 상기와 같은 방식으로 매주 배양하고, 배양된 균사체의 지름(MGR)을 측정하였다.

[0059] 그 결과, 첫 번째 배양(w1) 및 두 번째 배양(w2)에서 고농도의 메탄올이 포함된 배지에서 배양된 아스퍼질러스 속 미생물은, 메탄올이 포함되지 않은 배지에서 배양된 미생물에 비하여 균사체 지름이 작게 나타났으나, 세 번째 배양(w3)부터는 고농도의 메탄올 처리에도 불구하고 균사체의 크기가 매우 증가한 것을 확인하였다(도 3). 또한 네 번째 이후 배양(w4, 5, 6)에서도 세 번째 배양에서와 비슷한 크기의 균사체가 나타남을 확인하였다.

[0060] 따라서 상기 아스퍼질러스 속의 곰팡이는 메탄올에 적응하여 변이를 일으킨 것이며, 이러한 변이 여부는 도 2와 같이 육안으로도 구분할 수 있다.

[0061] **실험예 3. 변이된 미생물을 이용한 시트르산의 생성 확인**

[0062] (1) 브로모크레솔 그린을 이용한 확인

[0063] 상기 실험예 2에 따라 변이된 아스퍼질러스 속 미생물의 시트르산 생산 효과를 확인하기 위하여, 산염기 지시약인 브로모크레솔 그린(bromo cresol green)을 사용하였다. 상기 지시약은 산성 상태가 되면 노란색을 띄고, 약 산성, 중성, 염기성의 경우 푸른빛을 띤다. 따라서 미생물로부터 생산되어 배지로 배출되는 시트르산의 양이 많아질수록 균사체 주변의 노란색이 강해진다.

- [0064] 대조군으로는 메탄올에 처음 배양시키는 아스퍼질러스 나이저 44333(non-adapt.)을 메탄올이 없는 배지 또는 5%v/v의 메탄올을 포함하는 배지에서 배양시킨 그룹을 사용하였다.
- [0065] 그 결과, 도 4에 도시된 것과 같이 변이되지 않은 미생물(non-adapt.)을 메탄올을 포함한 배지에서 배양할 경우, 성장이 매우 저해되며 시트르산도 거의 생성하지 않은 반면, 메탄올에 의해 변이된(beneficial mutation) 미생물(Adapt.)의 경우, 고농도의 메탄올을 처리하더라도 증식 저해가 낮으며, 배지에 노란색이 매우 강하게 나타나 미생물에 의한 시트르산의 생산량이 매우 높음을 확인하였다. 한편, 변이되지 않은 미생물을 메탄올이 포함되지 않은 배지에서 배양할 경우, 증식률은 높았으나 시트르산의 생산량은 변이된 미생물에 비해 매우 적게 나타났다.
- [0066] (2) 시트르산의 정량
- [0067] 상기 실험에 2에서 변이된 미생물의 포자를 104(포자)/ml가 되도록 CZA(Czapek Dox Broth Agar, Sigma-Aldrich) 배지에 접종하였다. 4일 동안 34℃에서 배양한 후, 자란 곰팡이와 함께 배지를 작은 조각으로 자른 후, 그 조각을 50 ml 튜브에 넣고 온수조에서 100℃로 가열시켜, 고체 형태의 조각이 완전히 액체 형태가 되도록 하였다 액체형태가 된 용액을 종이 필터로 걸러, 균사체와 포자가 걸러내었다.
- [0068] 걸러진 물질들을 건조한 오븐에서 65℃로 건조시킨 다음, 건조 세포 중량(dry cell mass, g/kg)을 측정하였다.
- [0069] 걸러지고 액체만 남은 용액을 50℃로 식힌 다음, 10%v/v 타르타르산을 첨가하여, 100℃에서 2시간 동안 가열하여 아가(agar)를 가수분해하여 샘플을 얻었다. 이후, J.R. Marier 및 M. Boulet(J. Dairy Sci. 41, 1683-92, 1958)의 방법에 따라 시트르산의 양을 측정하였다. 구체적으로, 상기 샘플을 수조에서 32℃로 식힌 후, 분광광도계(spectrophotometer)의 큐벳에 샘플 12.5중량%, 피리딘(pyridine) 16.25중량%, 무수 아세트산(Acetic anhydride) 71.25중량%를 넣고 30분 동안 반응시킨 다음, 분광광도계에서 420 nm 파장으로 시트르산의 양(mg/kg)을 측정하였다.
- [0070] 그 결과, 도 5에 도시된 것과 같이, 메탄올에 적응하여 변이된 곰팡이(adap)는 1%v/v 메탄올 하에서 약 400mg/kg의 시트르산(ca)을 생산하는 반면, 메탄올에 처음 배양시키는, 즉 메탄올에 의해 변이되지 않은 곰팡이(n-adap)는 동일 농도(1%v/v)의 메탄올 하에서 약 170mg/kg의 시트르산을 생성하였다(약 2.4배 차이). 따라서 고농도의 메탄올에 적응된 곰팡이는 적응하지 못한 곰팡이에 비해 현저히 많은 양의 시트르산을 생산할 수 있음을 확인하였다.
- [0071] 또한 메탄올에 적응하지 못한 곰팡이는 메탄올의 독성 및 pH 변화에 의하여 시트르산의 생산능 뿐만 아니라 미생물의 성장 또한 현저히 감소하였음을 확인하였다.
- [0072] 따라서, 본 발명에 따른 메탄올에 적응하여 변이된 아스퍼질러스(Aspergillus) 속 미생물은 고농도의 메탄올 환경에서도 시트르산의 생산능을 현저히 향상시킬 수 있다.
- [0073] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0074]

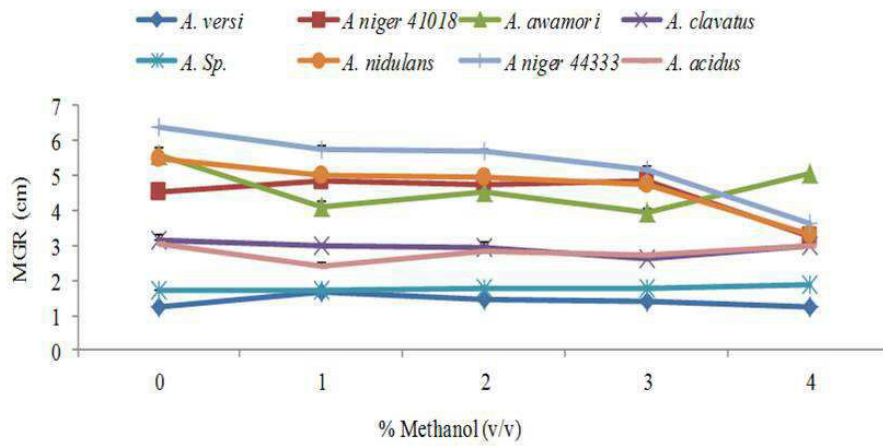
기탁기관명 : 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)

수탁번호 : KACC93201P

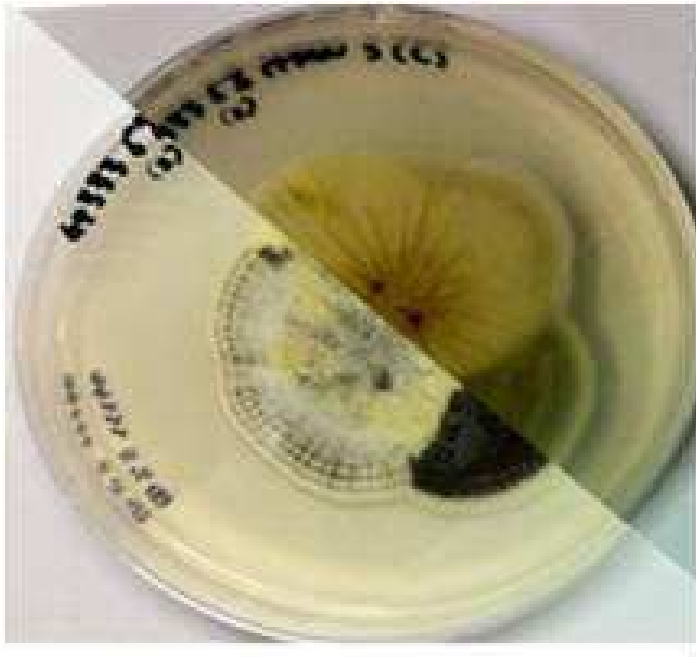
수탁일자 : 20140530

도면

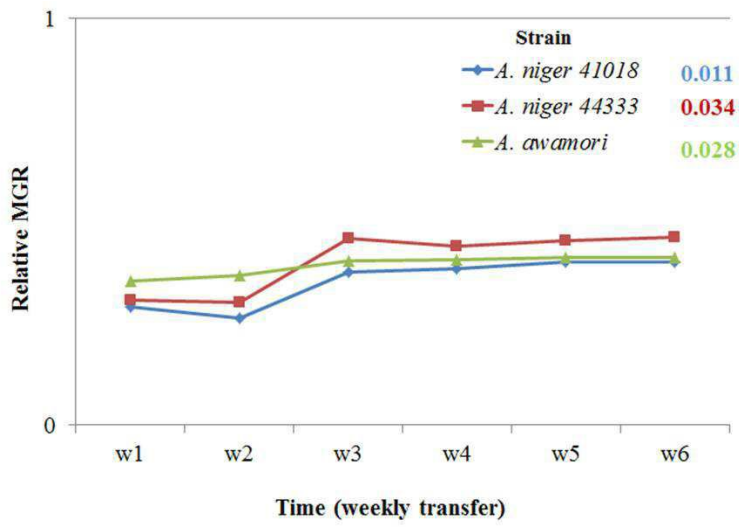
도면1



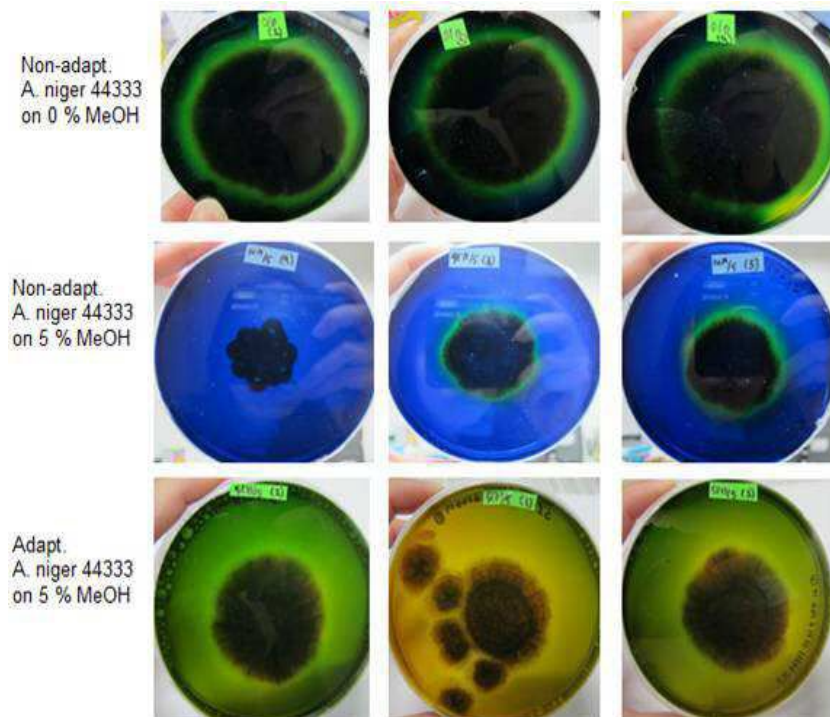
도면2



도면3



도면4



도면5

