

## 이타콘산 고생산성 *Aspergillus terreus* 변이주의 신속 선별을 위한 효율적인 균주 스크리닝 전략 개발

신우식, 김평현, 이도훈<sup>1</sup>, 김상용<sup>1</sup>, 정용섭<sup>2</sup>, 전계택\*

### Development of an Efficient Screening Strategy for Rapid Selection of High-yielding Mutants of Itaconic Acid Biosynthesized by Fungal Cells of *Aspergillus terreus*

Woo-Shik Shin, Pyeung-Hyeun Kim, Dohoon Lee<sup>1</sup>, Sangyong Kim<sup>1</sup>, Yong-Seob Jeong<sup>2</sup>, and Gie-Taek Chun\*

접수: 2011년 4월 26일 / 게재승인: 2011년 5월 13일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** An efficient screening method was developed for rapid selection of a few overproducers of itaconic acid (IA) among the great many mutants derived from mother strains of *Aspergillus terreus*. For this purpose, an attempt was made to reveal the relationships of the growth rate and sporulation of each mutant on PDA solid medium with its IA productivity in the final liquid production-culture. As a result, it was possible to classify the mutated strains into 5 groups (from [A] to [E] group) according to their morphologies (i.e., growth rate and sporulation extent) on the PDA slants. Notably, most of the high-yielding mutants of IA were observed to belong to [A] group which had the properties of the highest growth rate and sporulation among the 5 groups, whereas the mutant groups of [C], [D] and [E] with the contrasting morphological features showed significant reductions in their IA productivities. From these results, it was concluded that the probability of selecting IA overproducing mutants could be remarkably

enhanced when the mutated colonies showing faster growth rates are firstly selected on the PDA plate, and then further screening process is performed on the basis of the sporulation extents of the mutants selected. Consequently, through the application of the strategy developed in this study, costs and time involved in the labor-intensive task of strain improvement could be reduced to a great extent, because the time-consuming liquid culture processes did not need to be performed for the unfavorable mutants belonging to the groups other than group [A].

**Keywords:** itaconic acid, *Aspergillus terreus*, strain improvement, morphology, sporulation

#### 1. 서론

이타콘산 (itaconic acid)은 메틸렌 그룹과 두개의 카르복실 그룹을 갖고 있어 이 두 그룹간의 결합을 이용하여 폴리에스터 수지 및 여러 고분자 물질의 합성에 필요한 중간물질로 첨가되며, 현재 섬유, 도색제, 세척제, 제초제 및 제약산업 등 많은 분야에 걸쳐 폭넓게 이용되고 있고 그 수요량도 점차 늘어나고 있는 추세이다 [1-3]. 이타콘산은 미국 에너지성 (US DOE)이 미래의 대체 화학물질들 중 석유화학 모델, 화학적 자료, 시장 데이터, 특성, 효율성 등을 세밀하게 검토한 후, 선정 발표한 12개의 잠재적인 고부가가치 화학물질

강원대학교 의생명과학대학  
College of Biomedical Science, Kangwon National University,  
Gangwon 200-701, Korea  
Tel: +82-33-250-8547, Fax: +82-33-241-4627  
e-mail: gtchun@kangwon.ac.kr

<sup>1</sup>한국생산기술연구원

<sup>1</sup>Korea Institute of Industrial Technology, Cheonan 300-825, Korea

<sup>2</sup>전북대학교 응용생물공학부

<sup>2</sup>Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(top value-added chemicals) 중에 포함되어 있을 정도로 미래 시장성이 밝은 물질이다 [4].

이타콘산의 생산은 크게 화학적 방법 및 생물학적 방법으로 나눌 수 있다. 화학적 방법은 이타콘산의 전구물질인 citric acid나 cis-aconitic acid를 가열 분해하여 이타콘산을 얻는 방법인데, 이러한 방법은 화학반응 시 수반되는 여러 부작용 때문에 이타콘산의 산업적 생산은 주로 미생물에 의한 생물배양 공정에 의해 수행되고 있다 [5]. 이타콘산을 생합성하는 주요 미생물로서 현재까지 *Aspergillus*, *Helicobasidium mompa*, *Candida*, *Yeast*, *Ustilago zae* 등 다양한 균주들이 보고되었다. 이러한 균주들 중에서도 이타콘산의 산업적 생산은 주로 고등균류인 *Aspergillus terreus*에 의한 호기성 배양공정에 의해 이루어지고 있다 [6-8].

고등균류에 의한 이타콘산의 생합성 경로는 다수의 연구진에 의해 밝혀졌는데 [9-12]. 특별히 Bentley와 Thiessen은 TCA (tricarboxylic acid) cycle의 중간산물인 cis-aconitic acid가 cis-aconitic acid decarboxylase (CAD, EC 4.1.1.6)를 포함하는 *A. terreus*의 crude enzyme preparation에 의해 이타콘산으로 전환될 수 있음을 확인한 바 있다 [10]. Bonnarne [13] 등도  $^{14}\text{C}$  표지 대사산물의 추적에 의해 cis-aconitate가 CAD에 의한 decarboxylation반응에 의해 세포질에서 이타콘산으로 전환된다는 사실을 보고하였다. 그 후 Dwiarti 등 [14]의 연구진이 이타콘산 고생산성 균주인 *A. terreus* TN484-M1으로부터 55 kDa의 CAD를 정제하는데 성공하였다. 최근의 논문에서 Kanamasa [15] 등의 연구진은 이타콘산 고생산성 균주 (*A. terreus* TN484-M1)와 모균주의 유전자 비교연구를 통해, 두 균주의 CAD 유전자의 서열상의 차이는 없었으나 전자가 후자에 비하여 5배 가량 높은 CAD 유전자 전사 수준을 나타낸다는 주목할 만한 연구결과를 제시하였다. 이는 전자의 높은 이타콘산 생산성이 CAD의 높은 발현량에서 비롯된 것임을 의미하는데, 이들은 이 결과를 이용해서 생산 균주의 CAD의 활성을 높이는 것이 이타콘산 생산성을 높이는 좋은 전략이 될 수 있음을 제시하였다.

최근 환경과 지속가능성 (sustainability) 산업에 대한 관심 및 에너지 비용 상승에 대한 우려가 높아지면서 이타콘산의 생산을 둘러싼 환경도 급격하게 변화하고 있다. 특별히 이타콘산이 바이오매스 (biomass)로부터 바이오리파이너리 (biorefinery) 공정에 의해 생산 가능한 가장 유망한 화학물질들 중 하나인 것으로 확인되면서 [4], 저비용, 저에너지 소모, 친환경적인 이타콘산 생산공정 개발의 필요성이 높아지고 있다 [16]. 이를 위해서는 보다 효율적인 생물공정시스템의 확립이 요구되는데, 본 연구에서는 그 중에서도 최우선적으로 요구되는 이타콘산 고생산성 균주개발과 관련해서, 매우 효율적인 균주개발 전략을 제시하고자 한다. 이타콘산 생산균주인 *Aspergillus terreus*는 자낭균에 속하며 무성생식을 위하여 포자를 형성하는 균사형성 균류중의 하나이다 [17]. 돌연변이 과정을 통해 고생산성 균주를 선별함에 있어서 가장 중요한 단계는 수많은 단일포자 (콜로니)들 중에서 생산성이 높은 콜로니를 신속하게 선별하는 단계이다 [18]. 이를 위해 본 연구에서는 포자들에 대한 돌연변이 유도 후, 단일 콜로니가 PDA고체배지에서 성장하는 속도 및 배양형태

(morphology), 특히 포자형성 (sporulation) 정도와 이타콘산 생산성간의 상관관계 규명함으로써, 효율적이며 신속한 균주개발 방법 (high throughput screening) (HTS)을 확립하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주 및 보관

이타콘산 생산을 위해 본 연구에서 사용한 균주는 균사형성 고등균류인 *Aspergillus terreus*이다. NRRL1960 균주로부터 random screening과 rational screening 방법을 이용해서 얻은 NR38, NR109 및 1212.12 균주를 각각 모균주로 사용하여 다양한 변이주들을 유도하였다. 균주 보관은 포자형성배지인 PDA (potato dextrose agar) plate에 생산균주를 접종하여 7일 동안 28°C에서 배양한 후 20% glycerol을 이용하여 포자현탁액을 준비한 후, 이를 80°C에서 보관하였고, 필요 시 마다 꺼내어 PDA 배지에 100 µL씩 도말 하여 사용하였다.

### 2.2. 배양 배지 및 배양 조건

이타콘산 고생산성 균주 개발을 위해 사용된 배지는 통계학적인 방법에 의해 본 연구실에서 최적화된 배지를 사용하였다. 배양 목적에 따라 포자형성배지 또는 재생배지, 성장배지 및 생산배지로 구분하여 사용하였다. 각 배지의 조성은 다음과 같다:

- 포자형성배지 또는 재생배지: PDA (potato dextrose agar) 배지.
- 성장배지 (GM): glucose 55 g/L, yeast extract 5 g/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3 g/L,  $\text{MgSO}_4$  2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02 g/L.
- 생산배지 (PM): glucose 100 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5 g/L, PEG 5 mL/L, and 0.01% (v/v) of a trace metal solution (8.8 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 mg/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.005 mg/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.4 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 1 liter water).

선별된 각 변이주들의 배양은 목적에 따라 두 종류의 배양 방법 (미니어처 액상배양과 플라스크 액상배양)을 적용하였다. 미니어처 액상배양을 위해 28°C 포자형성배지에서 7일간 배양된 각각의 포자를 회수한 후 조업부피 960 µL의 성장배지가 들어있는 24-well microplate (각 well 당 조업부피 1.2 mL)에 20% (v/v)로 접종하여 37°C, 230 rpm에서 2일간 성장배양하였다. 그 후 각 변이주의 배양액을 800 µL의 생산배지가 들어있는 24-well microplate (각 well 당 조업부피 1.0 mL)에 20% (v/v)로 접종하여 37°C, 230 rpm에서 3-4일간 미니어처 생산배양을 수행하였다 (Fig. 6(B) 참고). 한편 미니어처 배양을 통해 선별된 고생산성 균주의 배양 생리학적 특성을 검증하기 위해 scale-up 배양인 플라스크 액상배양도 수행하였다. 각각의 균주에 대한 플라스크 성장배양은 미니어처 배양방법과 동일하게 28°C 포자형성배지에서 7일간 배양하여 형성된 포자를 종균으로 사용하여 수행되었다. 이 포자를 20% 글리세롤이 포함된 증류수로 회수하여 40 mL

의 성장배지가 들어있는 250 mL 플라스크에 10% (v/v)의 부피로 접종한 후, 37°C, 220 rpm에서 2일간 배양하였다. 이로부터 얻은 각각의 균사체를 40 mL의 생산배지가 들어 있는 250mL 플라스크에 10% (v/v)의 부피로 접종하여, 37°C, 230 rpm에서 4일간 최종 생산배양을 수행하였다.

**2.3. 균체 농도 및 이타콘산 정량분석**

플라스크 배양시 균체농도는 건조중량 (DCW) (dry cell weight)을 이용하여 측정하였다. 균일한 시료를 얻기 위해 homogenizer로 균일화 과정을 거친 후 10 mL의 배양액을 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 남아있는 당 및 염류들을 증류수로 세척한 뒤, 이를 weighing dish에 담아 90°C에서 12시간 건조 후 건조중량을 측정하여 1 L당 세포농도로 환산하여 나타내었다. 배양액의 이타콘산을 측정하기 위해 진탕배양된 혼합물을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였고, 이물질이 제거된 상등액을 20~40배 희석하고 0.4 µm의 microfilter에 통과시킨 후 이를 HPLC 정량분석 시료로 이용하였다. 이타콘산 분석을 위한 HPLC 운전조건은 다음과 같다:

- Column: Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 µm) (Kanto Chemical Co., Japan).
- Mobile phase: 2% acetonitrile (water: 0.15% phosphoric acid).
- Column temperature: 40°C by temperature controller.
- Detector: M720 absorbance detector (Younglin Co., South Korea).
- Detection wave length: 210 nm.
- Flow rate: 1.2 mL/min.
- Sample loop size: 20 µL.

**2.4. 이타콘산 고생산성 우량 변이주 개발을 위한 NTG 돌연변이 유발 방법**

NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 처리를 위해 PDA 배지에서 자란 포자를 20% glycerol이 포함된 증류수로 수거하여 filtration을 통해 잔여물이 제거된 순수한 포자를 취하였다. 수거한 포자를 0.1 M TM buffer (pH 8.6)로 두 번 세척한 후, hemocytometer를 이용하여  $1 \times 10^5$  spores/mL로 희석하였다. 0.1 M TM buffer에 현탁된 포자현탁액에 NTG stock으로부터 처리농도가 700~1000 µg/mL가 되도록 NTG를 첨가한 후 28°C에서 10~15분간 처리하였다. 이후 15,000 rpm으로 포자를 모아 0.1 M TM buffer (pH 7.2)로 두 번 세척하였다. 이를 PDA 재생배지에 도달한 후, 28°C에서 배양하면서 돌연변이된 콜로니를 선별하였다.

**3. 결과 및 고찰**

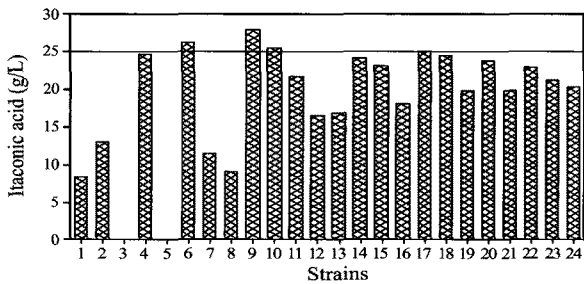
**3.1. 돌연변이주의 PDA plate고체배지에서의 성장속도와 액상 생산배양에서의 이타콘산 생산성과의 상관관계 (*Aspergillus terreus* NR38 균주를 모균주로 사용)**

본 연구에서 돌연변이 유발원으로 사용한 NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)는 염색체상의 GC pair를 AT

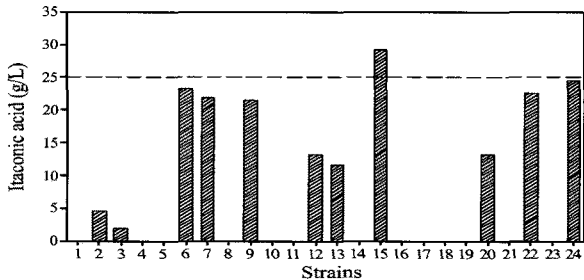
pair로 변환시키는 알킬화 물질 (alkylating agent)로서 높은 돌연변이율에 비해 낮은 치사율을 보이는 특징을 가지고 있어, 현재 균주개량 과정에서 가장 널리 이용되는 돌연변이 유발원 중에 하나이다 [19]. 이타콘산 고생산성 균주를 개발하기 위해 본 연구에서는 생산균주인 *Aspergillus terreus*의 포자 현탁액에 약 95%의 치사율을 나타내는 양의 NTG를 처리한 후, PDA 고체배지에서 재생한 돌연변이 균주들을 최종 액상 생산배양하여, 이들 중에서 이타콘산 생산성이 높은 균주들을 임의로 선별하는 균주개량 방법을 적용하였다. 이와 같은 random mutation 방법을 적용할 경우, 몇 가지 문제점이 발생하였는데, 첫째, 특정한 selective pressure (선별 압)가 없는 조건에서 재생된 변이주들이므로, 선별 기준 없이 임의의 균주들에 대해서 이타콘산 생산성 조사가 이루어져야 한다는 점, 둘째, 생산성의 증가와 감소에 대한 원인을 유전자 수준에서 설명하기 어렵다는 점, 셋째, 생산성과 무관한 염색체상에도 돌연변이가 유발되므로, 이타콘산 고생산성 균주를 지속적으로 선별하는 과정에서 잠재적으로 세포의 활성과 배양생리적 특성에 부정적인 영향을 미칠 수 있다는 점이었다 [19-21]. 따라서 이와 같은 무작위적인 균주 선별법의 단점을 보완하기 위해서, 본 연구에서는 변이주들의 PDA고체배지에서의 성장속도와 이타콘산의 생산성간의 상관관계를 조사하는 실험을 수행하였다.

이를 위해 25 g/L의 이타콘산 생산성을 갖는 *Aspergillus terreus* NR38 균주를 모균주로 이용하여 95%의 치사율로 NTG mutation을 수행한 후, PDA plate고체배지에서 1.5일간 28°C에서 배양하면서 변이주들을 관찰한 결과, 다양한 성장속도를 나타내는 변이주들을 확인할 수 있었다. PDA plate 상에서 성장속도가 빠른 그룹 (콜로니의 직경이 1.5일에 2 mm 이상 성장)과 느린 그룹 (콜로니의 직경이 1.5일에 1 mm 이하 성장)으로 나누어 각각 24개의 변이주를 선별한 후, 24-well microplate를 이용해서 미니어처 액상 배양배양과 생산배양을 수행하였다. Fig. 1에 제시한 바대로, 포자로부터 빠른 성장을 하는 그룹의 경우 대다수의 균주가 20~25 g/L의 이타콘산 생산성을 보인 반면 (Fig. 1(a)), 성장속도가 느린 그룹의 경우에는 많은 균주들이 이타콘산을 생산하지 못하였으며 일부의 균주들만이 이타콘산을 생산하고 있음을 확인하였다 (Fig. 1(b)). 즉 성장속도가 느린 변이주 그룹에서는 이타콘산을 생합성 하지 못하는 균주가 54%에 달했으며, 모균주와 유사한 생산성 (20~25 g/L)을 갖는 변이주가 약 20%, 모균주 보다 생산성이 높은 균주는 단 1개밖에 없는 것으로 나타났다. 이외는 대조적으로 성장속도가 빠른 그룹에서는 두 종류의 균주가 이타콘산을 생합성 하지 못하였고, 40% 이상의 균주에서는 모균주와 유사한 생산성이, 3개의 균주에서는 모균주 보다 더 높은 생산성이 있는 것으로 나타났다. 두 그룹에서 선별한 각 균주들의 이타콘산 생산성 분포 현황 (히스토그램) (Fig. 1(c))으로부터, 돌연변이 유발 후 빠른 성장속도를 보이는 변이주들을 선별할 경우, 이 균주들이 이타콘산 생산성이 높은 우량 균주가 될 확률이 꽤 높음을 알 수 있었다. 상기 결과로부터 변이주의 이타콘산 생합성 능력과 성장속도 간에 높은 상관관계가 존재함을 유추할 수 있었다. 변이주가 모균주와 성장속도가 비슷한 경우에는 NTG

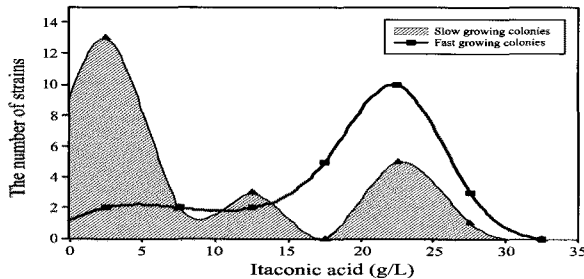
처리에 의한 DNA 염기서열 변이가 세포성장에는 큰 영향을 미치지 않으면서 이타콘산의 생합성을 증가시키는 방향으로 유도된 것으로 보인다.



(a) Group of fast growing colonies.



(b) Group of slow growing colonies.



(c) Histogram of each group.

**Fig. 1.** Comparison of itaconic acid production by each mutant belonging to (a) fast growing colonies and (b) slow growing colonies, and (c) comparison of histogram between the fast growing and the slow growing colonies (*Aspergillus terreus* NR38 strain used as a mother strain).

**3.2. 변이주의 고체배지에서의 성장속도 및 포자형성 정도가 이타콘산 생산성에 미치는 영향 (*Aspergillus terreus* NR109 균주를 모균주로 사용)**






다수의 돌연변이주들을 PDA plate 고체배지 상에서 포자로 부터 콜로니로의 성장속도에 근거해서 두 그룹으로 나누어 각 그룹에 속한 변이주들의 이타콘산 생합성능을 위에서 비교 분석한 바 있다. 이 실험을 수행할 때, 포자형성을 다량 유도 하기 위해 변이된 각각의 콜로니들을 PDA plate에서 PDA slant로 다시 옮긴 후, 여기서 수확한 포자들을 미니어처 액상배양을 위한 종균으로 사용하였는데 (Fig. 6(B) 참고), 이 PDA slant배양 중에 변이주가 다양한 성장형태를 띠며 존재 하는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 균주 개량을 위한 NTG 돌연변이 유발과정에서 살아남은 변이주들에게서 발생한 genotype의 변화 (염색체상의 다양한 염기서열 변화)가 고체배지인 PDA slant배양 중에 phenotype로 나타나고 있는 것으로 판단되었다. 따라서 각 변이주들의 PDA slant배지에서의 배양 형태 (morphology)가 미니어처 액상 배양에서의 이타콘산 생산성과 어떠한 상관관계가 있는지 체계적으로 조사하는 연구를 수행하였다.

본 연구를 위해 이타콘산 생산성 (23.7 g/L) 뿐만 아니라 생산 안정성도 우수한 *Aspergillus terreus* NR109 균주를 모균주로 이용하여 95%의 치사율로 NTG mutation을 수행한 후, 각 변이주들을 PDA plate에서 1.5일간 28 °C에서 배양 (initial stage로 정의)하면서 초기의 콜로니 성장속도에 따라 두 그룹 (fast-growing mutant group과 slow-growing mutant group)으로 우선 구분하였다. 그 후 각 그룹에 속한 변이주들이 PDA slant에서 포자가 형성되는 정도 (포자형성율)와 콜로니의 성장속도를 관찰하기 위해 28 °C에서 7일 동안 추가로 더 배양 (later stage로 정의) 한 결과 (Fig. 6참고), 각 변이주들을 이 두 종류의 특성이 매우 우수한 [A]그룹에서 부터, 두 특성 모두 현저히 낮은 [E]그룹으로 구분할 수 있었다 (Fig. 2) (Table 1). Fig. 2에 initial stage (PDA plate배양)에서 콜로니 성장속도가 빠른 그룹에 속했던 변이주들이 later stage (PDA slant배양)에서 보여준 대표적인 morphology 사진과 그 배양특성 (성장속도 및 포자형성율)을 각 그룹별

**Table 1.** Classification of the mutants based on their growth rates and extents of sporulation on PDA solid medium (from [A] to [E] group) (*Aspergillus terreus* NR109 strain used as a mother strain)

CHARACTERIZATION	CLASSIFICATION	Classification of the mutants				
		[A] group	[B] group	[C] group	[D] group	[E] group
Characterization of the mutants	Growth rate at the later stage	++++	+++	+++	+	++
	Extent of sporulation at the later stage	++++	+++	+	++	+
Initially fast-growing mutant group	The number of the mutants belonging to each group (total 120 mutants)	80 (66%)	22 (18%)	10 (9%)	5 (4%)	3 (3%)
	Average amount of itaconic acid produced by each mutant belonging to each group (g/L)	28.7 (g/L)	23.8 (g/L)	13.3 (g/L)	0 (g/L)	0 (g/L)
Initially slow-growing mutant group	The number of the mutants belonging to each group (total 100 mutants)	18 (18%)	7 (7%)	8 (8%)	50 (50%)	17 (17%)
	Average amount of itaconic acid produced by each mutant belonging to each group (g/L)	24.1 (g/L)	23.2 (g/L)	11.5 (g/L)	4.5 (g/L)	5.8 (g/L)

로 비교 제시하였다.

Types	A	B	C	D	E
Morphology					
Growth rate	++++	+++	+++	+	++
Sporulation	++++	+++	+	++	+

**Fig. 2.** The photographs showing the morphology of each mutant group (The mutants were derived from the mother strain (*Aspergillus terreus* NR109) having the characteristics of fast growth and high extent of sporulation. The derived mutants are classified into five groups (from [A] to [E] group) based on their growth rates and extents of sporulation on PDA slant following NTG mutagenesis.) (++++: excellent, +++: very good, ++: good, +: fair).

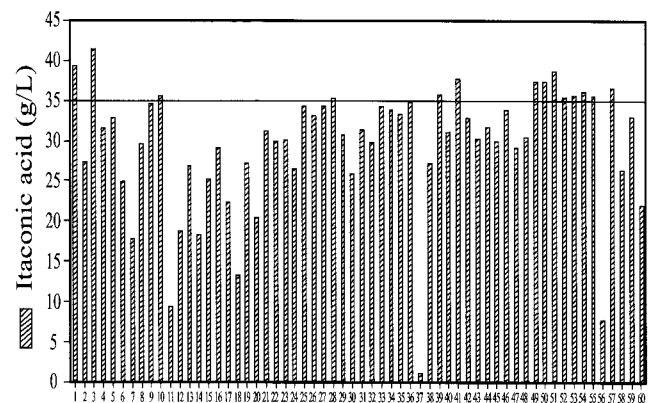
각 그룹에 속한 변이주들의 이타콘산 생산성을 조사하기 위해 각 PDA slant로부터 종균을 준비하여 액상배양을 수행하였다. 초기에 성장속도가 빠른 그룹의 경우 총 120개의 변이주에 대해서, 느린 그룹의 경우에는 총 100개의 변이주에 대해서 24-well microplate를 이용한 미니어처 액상 배양과 생산배양을 각각 수행하였다. 그 결과 초기에 성장속도가 빠른 그룹 (initially fast-growing mutant group)에서는 대부분의 균주가 [A]그룹 (66%)과 [B]그룹 (16%)에 속한 반면, 초기에 성장속도가 느린 그룹 (initially slow-growing mutant group)에서는 대부분의 균주들이 [D]그룹 (50%)과 [E]그룹 (17%)에 분포하고, [A]그룹과 [B]그룹에는 단지 18%와 7% 정도가 각각 속해있는 것으로 확인되었다 (Table 1). 이로부터 돌연변이 후 초기 germination이 느린 균주들의 경우 과도한 DNA상의 변이로 인해서 세포성장 또는 (및) 포자형성에 관여하는 유전자 부분에 비교적 심각한 변화가 초래되었으며, 그 결과 이타콘산의 생산성 저하 및 later stage에서 세포성장이 지연된 것으로 보인다 (initially slow-growing mutant group의 [D]그룹과 [E]그룹이 이에 해당함). 이타콘산의 생산성 면에서 볼 때, initial stage의 콜로니 성장속도에 관계없이 [A]그룹과 [B]그룹에 속한 변이주들의 평균 이타콘산 생산성이 다른 비교군 ([C], [D], [E]그룹)에 비해 현저하게 높은 것으로 나타났음은 주목할 만하다 (Table 1). 특별히 later stage에서 콜로니 성장속도와 포자형성율이 가장 우수한 [A]그룹에 속한 변이주들의 평균 이타콘산 생산성은, initial stage에서 빠른 성장을 보인 그룹의 경우에는 28.7 g/L, 느린 성장을 보인 경우에는 24.1 g/L로서, initial stage에서의 콜로니 성장속도에 관계없이 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 1을 체계적으로 분석해 보면, 이타콘산 생산성이 높기 위해서는 선행조건으로 각 변이주들의 later stage에서의

성장속도가 높아야만 함을 알 수 있다 (최소 +++ 이상). 또한 이러한 균주들의 경우 PDA slant에서의 포자형성 정도가 성장속도에 비해 이타콘산 생산성 향상에 비교적 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 이러한 결론은 [B]그룹과 [C]그룹의 later stage에서의 성장속도, 포자형성율 및 이타콘산 생산성을 비교해보면 유추할 수 있다. 즉 [B]그룹에 속하는 균주들이 [C]그룹 균주들에 비해 성장속도 면에서는 거의 대등하나, 이타콘산 생산성 면에서는 포자형성율이 높은 이유 (+++ vs. +)로 인해 initial stage에서 빠른 성장을 보인 그룹의 경우에는 1.8배 (23.8 vs. 13.3g/L), 느린 성장을 보인 경우에는 2.0배 (23.2 vs. 11.5g/L) 더 높은 것으로 확인되었다.

**3.3. 이타콘산 고생산성 변이주들의 PDA 고체배지에서의 배양 특성 재조사 (*Aspergillus terreus* 1212.12 균주를 모균주로 사용)**

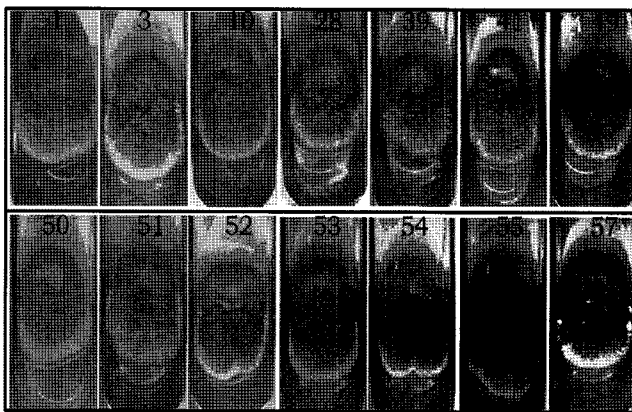
상기의 결과를 재확인하기 위해 이번에는 이타콘산 생산성 (35g/L)이 꽤 높은 1212.12 균주를 모균주로 하여 치사율 95%의 농도로 NTG mutation을 수행하였다. 일차적으로 빠른 성장을 하는 콜로니들을 선별하여 이전과 동일한 방법으로 배양실험을 수행하였다. 즉 변이된 포자로부터 초기단계 (initial stage)에 빠른 성장을 보이는 콜로니들을 무작위로 일차적으로 선별한 후, PDA slant고체배양을 통하여 다량의 종균들을 확보하였다. 그 후 이 균주들에 대하여 일련의 액상 배양실험 (24-well microplate 성장배양 및 생산배양)을 수행한 후, 각 균주들의 이타콘산 생산성을 조사하여 고생산성 균주들이 PDA slant 고체배지에서 보여주는 배양특성과 연계시켰다.



**Fig. 3.** Comparison of itaconic acid production by each mutant belonging to the initially fast growing group of [A] (*Aspergillus terreus* 1212.12 strain used as a mother strain).

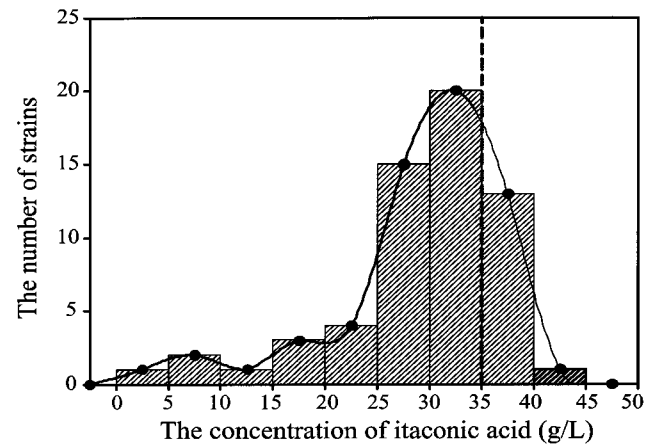
최종 액상생산배양 결과, 모균주의 생산성인 35 g/L보다 더 높은 생산성을 갖는 변이주들을 다수 선별할 수 있었다 (Fig. 3). 이들 중 이타콘산 생산성이 35 g/L 이상인 균주들의 PDA slant에서의 배양 특성을 관찰해 본 결과, Fig. 4에 제시한 바와 같이 모두 포자형성능이 탁월한 [A]그룹에 속하는 변이주들을 다시 한번 확인할 수 있었다. 전체 변이주들에 대한 이타콘산 생산성을 히스토그램으로 분석한 결과, initial stage에서 성장속도가 빠른 균주들의 경우 대부분

본이 이타콘산 고생산성이며 고안정성 특성의 변이주인 것으로 관찰되었다 (Fig. 5). 한편 이들 중 later stage에서 성장속도가 늦거나 포자형성율이 낮은 몇몇 변이주들의 경우 이타콘산 생산성이 여전히 10 g/L 이하로 매우 낮게 나타났는데, 이로부터 저 생산성 균주의 경우, 돌연변이 유발 후 세포의 활성 유지에 관여되는 유전자들에 심각한 변이가 발생하였으며, 그 결과 PDA slant배양 시 성장속도가 느려지고, 포자형성능이 매우 떨어진 것으로 보인다. Rowlands [19] 등은 cephalosporin C의 고생산성 균주개발 연구에서, 과도한 돌연변이율이 생산성을 저해할 수 있으며, 따라서 최적의 mutation dose를 찾아야 한다고 보고한 바 있다. 즉 높은 치사율을 갖는 변이조건에서는 염색체 전반에 걸쳐 과도한 변이가 유발됨으로써 선별된 변이주의 생산성 및 안정성이 낮다는 사실을 발견하였다. 본 연구 결과에서도 비슷한 경향이 나타났는데, 과도하게 변이를 일으켜 PDA slant에서 성장속도가 늦거나 포자형성능이 현저히 떨어지는 변이주의 경우 ([C], [D], [E]그룹에 속함), 예외 없이 액상 생산배양 공정에서 이타콘산 생산성이 매우 낮은 것으로 확인되었다. 반면에 PDA slant배양시 성장속도가 빠르거나 포자형성능이 높은 변이주들의 경우에는 세포활성과 관련된 유전자의 변이는 비교적 적고, 오히려 이타콘산 생합성에 관련된 다수의 유전자들에게서 이타콘산 생산성 증가를 유도하는 방향으로 변이가 발생한 것으로 보인다. 이러한 가정은 각 균주들의 이타콘산 생산성에 대한 정량적 분석으로도 가능하지만, 고생산성 균주들이 갖는 독특한 특성인 매우 향상된 포자형성능으로 부터도 추론할 수 있다. 일반적으로 다양한 종류의 이차대사산물 생산균주인 방선균 또는 고등균류의 경우 배양환경이 세포 성장에 매우 부적절한 상태 (필수 영양분의 고갈 등)로 변환되는 시점에서, 세포대사가 일차대사인 성장단계 (cell growth phase)에서 이차대사인 이차대사산물 생산단계 (idiophase)로 전환되며 [22], 이 때 생산균주의 분화 (differentiation)과정인 포자형성 (sporulation)에 관여하는 다양한 유전자들의 발현이 동시에 진행된다고 많은 연구자들에 의해 보고된 바 있

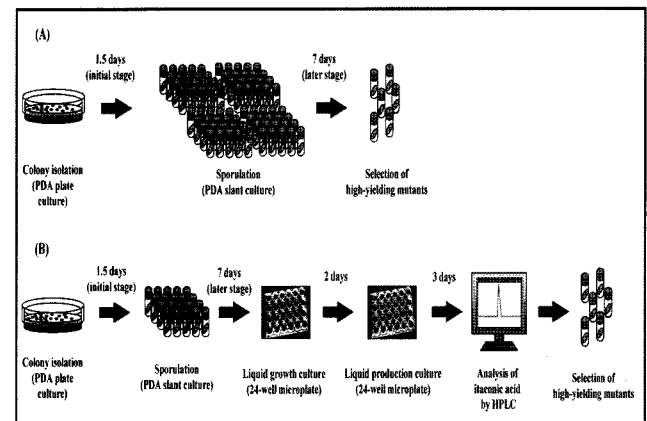


**Fig. 4.** The photographs showing the morphology of each mutant with high productivity of itaconic acid (Each mutant was derived from the mother strain (*Aspergillus terreus* 1212.12) having the characteristics of fast growth and high extent of sporulation. The number in each PDA slant indicates the number of each high-yielding mutant as demonstrated in Fig. 3 above.)

다 [23]. 이상의 결과를 요약하면, 이타콘산 고생산성의 변이주를 신속하게 선별하기 위해서는 변이된 포자들로부터 콜로니로의 성장속도가 빠른 변이주들을 1차적으로 선별한 후, 이 중에서도 포자형성율이 높은 균주들을 집중적으로 선택할 경우, 이 변이주들이 최종 액상배양에서 이타콘산 생산성이 높은 우량균주가 될 확률이 매우 높음을 알 수 있었다.



**Fig. 5.** Histogram for the production of itaconic acid by each mutant belonging to the initially fast growing group of [A] (*Aspergillus terreus* 1212.12 strain used as a mother strain).



**Fig. 6.** Schematic diagram for rapid screening of high-yielding mutants of itaconic acid (A) based on growth rate and sporulation extent of each mutant on the PDA slant culture; (B) based on itaconic acid production in the miniaturized liquid production cultures.

Fig. 6에 본 연구를 통해 개발한 고효율의 균주개량시스템을 기존에 사용해 오던 액상배양에 근거한 균주개량 시스템과 비교하여 제시하였다 (Fig. 6). 결론적으로, 균주개량을 위해 본 연구실에서 개발한 상기의 고속균주선별 (high throughput screening) (HTS) 시스템을 적용할 경우, 모든 변이주들에 대해 기존에 수행해 오던 장기간에 걸친 일련의 액상 성장배양 (2일 소요)과 액상 생산배양 (3일 소요) 공정을 수행할 필요가 없고, 생산성이 높을 것으로 판단되는 변이주들에 대해서만 이러한 액상 배양공정을 적용하게 되므로, 많은 인력 및 장비, 시간, 비용이 절약될 수 있을 것으로 판단

된다. 또한 이러한 HTS시스템을 균주선별 초기단계에서 변이주에 selection pressure (다양한 antimetabolites 이용)를 가해 주는 rational screening 균주개량 방법 [24]과 접합시킬 경우, 균주개량의 효율성은 실로 크게 증가될 것으로 기대된다. 한편 고생산성의 균주를 선별함에 있어서 또 다른 가장 중요한 단계는 가능한 한 많은 종류의 균주들을 액상배양하는 단계이다. 현재 본 연구실에서는 이와 같은 rational screening 균주개량 전략을 이용할 뿐만 아니라, 선별된 균주들에 대한 액상배양 공정 자체도 다량의 변이주들의 생산성을 신속하게 조사할 수 있는 미니어처 액상배양 (실험방법에 제시)으로 수행되고 있으므로, 조만간 이타콘산 생산성이 매우 높은 산업용 균주가 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

**4. 결론**

이타콘산 (itaconic acid)을 대량 생산하기 위해 *Aspergillus terreus* 고생산성 변이주를 신속하게 선별하는 균주개량 방법을 고안하였다. 돌연변이 과정을 통해 고생산성 균주를 선별함에 있어서 가장 중요한 단계는 수많은 단일포자들 중에서 생산성이 높은 변이주 (콜로니)를 신속하게 선별하는 단계이다. 이를 위해 본 연구에서는 포자들에 대한 NTG 돌연변이 유도 후, 단일 콜로니가 PDA 고체배지에서 성장하는 속도 및 배양형태 (morphology), 특히 포자형성 (sporulation) 정도과 이타콘산 생산성간의 상관관계 규명함으로써, 효율적이며 신속한 균주개발 방법 (high throughput screening) (HTS)을 확립하고자 하였다. PDA slant에서 재생되는 각 변이주들을 성장속도 및 포자형성 정도에 따라 분석한 결과, [A]그룹에서 [E]그룹까지 총 5종류로 구분할 수 있었다. 이들 중 이 두 가지 특성이 가장 훌륭한 [A]그룹에 속하는 변이주들의 경우, 이타콘산 생산성 및 안정성이 가장 훌륭한 것으로 확인되었다. 반면 이 두 가지 특성이 모두 낮은 그룹 ([C], [D], [E]그룹)에 속하는 변이주들의 경우 이타콘산 생산성이 현저히 낮게 나타났다. 따라서 이타콘산 고생산성의 변이주를 신속하게 선별하기 위해서는 변이된 포자로부터 콜로니로의 성장속도가 빠른 변이주들을 PDA 고체배지에서 우선 선별한 후, 이 중에서도 포자형성율이 높은 균주들을 집중적으로 선택할 경우, 이 변이주들이 최종 액상 생산 배양 공정에서 이타콘산 생산성이 높은 우량 균주가 될 확률이 매우 높음을 알 수 있었다. 이러한 균주개량 전략을 적용할 경우, 모든 변이주들에 대해 기존에 수행해 오던 장기간에 걸친 일련의 액상 성장배양 (2일 소요)과 액상 생산배양 (3일 소요)이 불필요해지고, 생산성이 높을 것으로 판단되는 변이주들에 대해서만 이러한 액상배양 공정을 수행하게 되므로, 노동집약적인 균주개량 공정에서 인력 및 장비, 시간, 비용이 크게 절약되는 것으로 확인되었다.

**감사**

본 연구는 한국에너지관리공단 (Energy Technology Innovation

Project), 2단계 BK21 사업, 강원대학교 생명공학연구소의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**References**

1. Tevž, G., M. Benčina, and M. Legiša (2010) Enhancing itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 1657-1664.
2. Gyamerah, M. (1995) Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 356-361.
3. Tsukamoto, S., T. Yoshida, H. Hosono, T. Ohta, and H. Yokosawa (2006) Hexylitaconic acid: A new inhibitor of p53-HDM2 interaction isolated from a marine-derived fungus, *Arthrinium spp.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 69-71.
4. Tong, X., Y. Ma, and Y. Li (2010) Biomass into chemicals: Conversion of sugars to furan derivatives by catalytic processes. *Appl. Catal. Gen.* 385: 1-13.
5. Bressler, E. and S. Braun (2000) Conversion of citric acid to itaconic acid in a novel liquid membrane bioreactor. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 75: 66-72.
6. Willke, T. and K. Vorlop (2001) Biotechnological production of itaconic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 289-295.
7. Lin, Y., Y. Li, M. Huang, and Y. Tsai (2004) Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Aspergillus terreus* to alleviate the effect of a short break in aeration during culture. *Biotechnol. Lett.* 26: 1067-1072.
8. Flippi, M., J. Sun, X. Robellet, L. Karaffa, E. Fekete, A. P. Zeng, and C. P. Kubicek (2009) Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus spp.* *Fungal Genet Biol.* 46 Suppl 1: S19-S44.
9. Okabe, M., D. Lies, S. Kanamasa, and E. Y. Park (2009) Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 597-606.
10. Shimi, I. R. and M. S. Nour El Dein (1962) Biosynthesis of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Archiv für Mikrobiologie.* 44: 181-188.
11. Bentley, R. and C. P. Thiessen (1957) Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. II. Early stages in glucose dissimilation and the role of citrate. *J. Biol. Chem.* 226: 689-701.
12. Bentley, R. and C. P. Thiessen (1957) Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. III. The properties and reaction mechanism of cis-aconitic acid decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 226: 703-720.
13. Bonnarne, P., B. Gillet, A. M. Sepulchre, C. Role, J. C. Beloeil, and C. Ducrocq (1995) Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *J. Bacteriol.* 177: 3573-3578.
14. Dwiarti, L., K. Yamane, H. Yamatani, P. Kahar, and M. Okabe (2002) Purification and characterization of cis-Aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 29-33.
15. Kanamasa, S., L. Dwiarti, M. Okabe, and E. Y. Park (2008) Cloning and functional characterization of the cis-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 223-229.
16. Archer, D. B., I. F. Connerton, and D. A. MacKenzie (2008) Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 111: 99-147.
17. Yu, J. H. and A. H. Thomas (1999) *Manual of Industrial*

- Microbiology and Biotechnology*. 2nd ed., pp. 417-434. ASM press, Washington, D. C., USA.
18. Osada, H. (2010) Introduction of new tools for chemical biology research on microbial metabolites. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1135-1140.
  19. Rowlands, R. T. (1984) Industrial strain improvement: Mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 3-10.
  20. S. Parekh, V. A. Vinci, and R. J. Strobel (2000) Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 287-301.
  21. Dmain A. (1971) Overproduction of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation. *Adv. Biochem. Eng.* 1: 113-142.
  22. Roze, L. V., A. Chanda, and J. E. Linz (2011) Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. *Fungal Genet. Biol.* 48: 35-48.
  23. Crueger, W. and A. Crueger (1990) *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. 2nd ed., pp. 9-58. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
  24. Percival Zhang, Y., M. E. Himmel, and J. R. Mielenz (2006) Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24: 452-481.