

## 발효에 의한 라이신(L-Lysine) 생산에 관한 연구 (2)

영양요구성 변이주에 의한 Lysine 생산

민 태 익 · 김 향 목 · 권 태 완

한국과학기술연구소 식량자원연구실

(1972년 3월 31일 수리)

## Studies on the Production of Lysine by Fermentation Process (2)

Lysine Production by Auxotrophs

by

Tae-Ick Mheen, Hang-Mook Kim\* and Tai-Wan Kwon

Food Resources Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(Received March 31, 1972)

### Abstract

Over 90 of lysine producing auxotrophs were obtained from *Corynebacterium sp.* S-27-12, *Brevibacterium flavum* ATCC 15168 and *Micrococcus glutamicus* ATCC 13032 by UV light,  $Co^{60}$  irradiation and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine treatment.

One of the mutant, *Brev. flavum* U46-N59, was identified as a leucine auxotroph and accumulated lysine during flask (500 ml) cultivation (180 strokes/min.) up to 21.6 mg per ml of broth at pH 7.5 and 28°C after 4 days. The medium consisted of glucose, 100; urea, 10; corn steep liquor, 40;  $KH_2PO_4$ , 2;  $K_2HPO_4$ , 0.5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.4; antifoam S-57, 1 g;  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot XH_2O$ , 10;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 10 mg; biotin, 30; thiamine-HCl, 100  $\mu$ g in 1 l of distilled water, and 40 U/ml of penicillin was added after 36 hrs fermentation.

### 서 언

Lysine 생산의 중요성은 우리나라와 같이 그 식생활을 대부분 곡류자원에 의존하고 있는 나라에서 강조되는 것으로서, 곡류에 일반적으로 결핍되는 lysine을 보충 첨가함으로써 곡류단백질을 질적으로 향상시키는 것이 오늘날 국민의 영양 향상을 꾀하는 가장 경제적인 방책의 하나로 대두되고 있다.

전보<sup>(1)</sup>에서는 국내에서 수집한 토양시료로부터 lysine 생산균주를 광범위하게 분리한 바 있으나, 야생균주로부터의 lysine 생산은 한계성이 있음을 알았다. 본 연구에서는 lysine의 공업적 생산을 목표로 전보에서 밝힌 lysine 생산 후보 균주와 기타 균주들을 사용하여 영양요구성 변이주를 유발시킴으로써 lysine을 현저히 생산 촉진하는 leucine 요구성 변이주를 확보하고 이 leucine 요구주에 의한 lysine 촉진의 최적 배양조건을

검토하였다.

영양요구성 변이주를 이용한 발효법에 의한 lysine의 생산은 현재 일본, 미국 등지에서 homoserine 요구주에 의해서 공업적으로 실시되고 있으며, 그 생산량은 수 10 mg/ml에 이르고 있으나 leucine 요구주에 의한 lysine의 생산에 대하여는 별로 보고된 바 없는 듯하다.

실 험 방 법

1. 사용균주

전보<sup>(1)</sup>에서 밝힌 *Corynebacterium sp.* S-27-12와 American Type Culture Collection (ATCC)에서 입수

한 glutamic acid 생산균주 *Brevibacterium flavum* ATCC 15168 및 *Micrococcus glutamicus* ATCC 13032를 친주(parent strain)로 하여 자외선(15 W germicidal lamp), Co<sup>60</sup> 및 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)을 처리함으로써 영양요구성 변이주를 유도하였다.

2. 사용배지

영양요구성 변이주를 얻기 위해서는 표 1의 최소(MM), 보충(SM-A, SM-B) 및 완전배지(CM)를 사용하였으며, 변이주의 lysine 생산용 배지로는 표 2의 P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> 및 P<sub>3</sub> 배지를 사용하였다.

표 1. Media used for the isolation of auxotrophs

Media Ingredients	Minimal Medium (MM)	Supplemented Medium (SM)		Complete Medium (CM)
		A	B	
Glucose	5.0(g/L)	5.0(g/L)	5.0(g/L)	10.0(g/L)
Yeast extract				10.0
Peptone				5.0
NaCl				2.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.5	1.5	1.5	
Urea	1.5	1.5	1.5	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0	1.0	1.0	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.0	3.0	3.0	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	0.1	0.1	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10.0(mg/L)	10.0(mg/L)	10.0(mg/L)	
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	5.0	5.0	5.0	
Thiamine-HCl	100.0(μg/L)	100.0(μg/L)	100.0(μg/L)	
Biotin	30.0	30.0	30.0	
L-homoserine		50.0(mg/L)		
L-methionine		50.0		
DL-threonine		100.0		
Vitamin free casein hydrolysate			2.0(g/L)	
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

3. 변이주의 분리

영양요구성 변이주는 Scheme 1과 같은 과정을 거쳐서 분리하였다.

가) 자외선 처리: 표 1의 완전 및 최소배지에서 배양한 대수증식기의 세포를 원심분리 후, 생리적 식염수로 2회 세척하여 직경 9 cm의 petri dish에 5 ml (현탁액, 10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup> cells/ml)를 넣은 후 진탕하면서 자외선을 2 cm의 거리에서 15~60 초 조사하였다. 자외선 조사액은 2 시간 동안 어두운 곳에 보존 후 완전배지에 배양, 이를 다시 원심분리, 세척하여 최소배지에 2 시간 동안 배양하다가 항생물질을 처리하여 변이주를 농축시킨 후 완전배지 평판상에 24~48 시간 배양하여 생

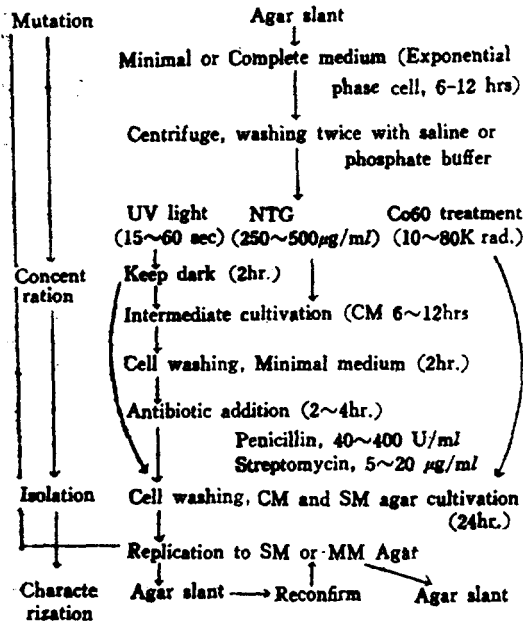
긴 colony를 보충배지(A,B)와 최소배지에 복사하여 다시 30°C에서 48~72 시간 배양 후 보충배지에는 생육하고 최소배지에는 생육하지 않는 colony만을 영양요구성 변이주로 분리하였다.

나) NTG 처리: 완전배지에서 배양한 대수증식기의 세포현탁액 (10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup> cells/ml) 1 ml를 NTG 250~500 μg/ml를 가한 배양액 (40 ml/500 ml 플라스크)에 접종, 30°C에서 30~120 분간 배양한 후 원심분리, 생리적 식염수로 2회 세척하여 자외선 처리시와 같은 방법으로 변이주를 분리하였다.

다) Co<sup>60</sup> 처리: Co<sup>60</sup>의 처리는 방사선화학연구소에 있는 BNL Shipboard Irradiator 25,000 Ci 방사선

표 2. Media used for the production of lysine

Media	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>
Glucose	100.0(g/l)	100.0(g/l)	100.0(g/l)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20.0	—	—
Urea	—	10.0	10.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.0	0.5	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0	2.0	2.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10.0(mg/l)	10.0(mg/l)	10.0(mg/l)
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	7.0	7.0	7.0
Yeast extract	2.0(g/l)	2.0(g/l)	1.0(g/l)
Peptone	2.0	2.0	—
Vitamin free casein hydrolysate	—	—	4.0
Biotin	30.0(μg/l)	30.0(μg/l)	30.0(μg/l)
Thiamine-HCl	100.0	100.0	100.0
CaCO <sub>3</sub>	10.0(g/l)	—	—
pH	7.0	7.4	7.4



Scheme 1. Process of auxotrophs isolation

조사기로 완전배지에서 배양한 대수증식기의 세척세포 현탁액 (10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup> cells/ml)을 30~240 초 (10~80 k rad) 처리한 후 자외선 처리시와 같은 방법으로 분리하였다.

변이주의 확인 : 변이주의 확인은 auxanography 법<sup>(2)</sup>과 각 아미노산의 결체배양에 의해서 행하였다.

4. 변이주의 배양

영양요구성 변이주의 lysine 생산능을 비교하기 위해서는 대형 시험관을 사용하였으며 선정된 lysine 생산균

주의 lysine 측정 조건을 검토하기 위해서는 500 ml 의 삼각플라스크를 사용하였다. 종균은 완전배지에서 24 시간 전배양한 균액을 2%량으로 접종하여 30°C에서 72~96 시간 진탕배양 (140~180 strokes/min)하였다.

5. 분석법

가) 생육 : 균체의 생육은 배양액을 원심분리, 침전된 균체를 20 배로 희석하여 colorimeter(Spectronic 20)로 660 mμ에서 흡광도를 측정하였으며, CaCO<sub>3</sub>를 첨가하여 배양한 경우는 4N HCl로 CaCO<sub>3</sub>를 제거한 후 같은 배율로 희석하여 측정하였다.

나) pH : 배양후 발효액의 pH는 pH meter(Beckman Model 180)와 Toyo pH paper로 측정하였다.

다) 포도당 : 포도당의 정량은 Somogyi-Nelson 비색정량법<sup>(3)</sup>으로 행하였다.

라) Lysine : 배양액을 원심분리하여 그 상등액을 10~20 배로 희석한 후 thin layer chromatography법 (전개용매, butanol: acetic acid: water=4:1:1 및 phenol: water=4:1, 발색시약, 0.3% ninhydrin ethanol 용액)으로 lysine의 생산 유무를 확인한 후 *Pediococcus cerevisiae* ATCC 8042를 이용한 bioassay 법<sup>(4)</sup>으로 정량하였다.

마) 기타 아미노산 : Lysine 이외의 아미노산은 특히 현저히 생산된 것만 TLC 법으로 확인하였다.

실험결과 및 고찰

1. 영양요구성 변이주의 분리

자외선 처리 총 12회, NTG 처리 총 8회, Co<sup>60</sup> 1회

의 처리에서 분리된 아미노산 및 미지물질 요구성 변이주는 표 3 과 같다. 균주별로는 *Brev. flavum* ATCC 15168 이, 변이유기원별로는 자의선 처리에서 가장 많은 변이주를 얻었다.

표 3. Number of auxotrophic mutants

Strain	Amino acid required	Substance unknown required
<i>Corynebacterium</i> sp. S-27-12	10	8
<i>M. glutamicus</i> (ATCC 13032)	16	3
<i>Brev. flavum</i> (ATCC 15168)	42	5
<i>Brev. flavum</i> U-46	5	2
Total	73	18
UV light	54	10
NTG	16	6
Co <sup>60</sup>	3	2
Total	73	18

2. 변이주에 의한 lysine 의 생산

최종적으로 영양요구성 변이주로 확인된 91 균주에 대하여는 표 2 의 lysine 생산용배지에 96 시간 진탕배양하여 lysine 의 생산능을 비교한 바 표 4 에서 보는데와 같이 lysine 8 mg/ml 이상인 균주 6 주를 분리하였으며 그 중 lysine 생산이 가장 우수한 *Brev. flavum* U46-N59 는 leucine 요구성 변이주였다.

4. List of the lysine producing auxotrophs

Strain	Required aminoacids	Lysine (mg/ml)	Other aminoacid (mg/ml)
<i>Brev. flavum</i> U46	Leucine	8.0	Valine 6.0~8.0
<i>Brev. flavum</i> U46-N59	Leucine	12.2	
<i>Brev. flavum</i> N52	Methionine sensitive	10.0	Unknown 10.0
<i>Brev. flavum</i> N341	Tyrosine	11.4	
<i>Brev. flavum</i> U741	Cystine sensitive	4.7	
<i>Corynebacterium</i> sp. AU-1	Unknown	8.4	
<i>M. glutamicus</i> U-125	Methionine	8.2	

3. *Brev. flavum* U46-N59 의 lysine 축적조건 검토

가) pH

Lysine 축적에 미치는 시발 pH 의 영향을 알아보기 위해서 기초배지에 질소원으로 urea 0.6%와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0%를 각각 첨가하여 비교해 본 결과는 그림 1 과 같다

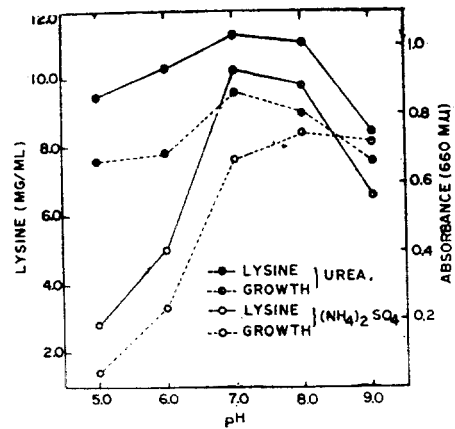


그림 1. Effect of initial pH on lysine production

Basal medium A: Glucose 10.0(%), Urea 0.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.001, Yeast extract 0.1, Vitamin free casein hydrolysate 0.6, Biotin 30(μg/L), Thiamine-HCl 100(μg/L).

B: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2, All other legends are the same as medium A.

Cultivation: 86 hrs at 30°C.

그림 1 에서 보는 바와 같이 질소원으로 urea 나 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였을 경우 다 같이 pH 7.0~8.0 에서 lysine 의 생산은 가장 양호한 결과를 보였다. 균의 생육은 urea 를 사용하였을 경우 pH 에 관계없이 양호하였으나 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였을 때는 pH 6.0 이하에서는 불량하였고 lysine 의 생산도 감소하였다. 이는 Erickson 과 Kurz<sup>(6)</sup>가 *Ustilago maydis* 의 lysine 생산에서 최적 pH가 4.5라고 보고한 바와는 일치하지 않으나, Aida 등<sup>(8)</sup>과 中山과 木下<sup>(7)</sup>등의 *Bacillus subtilis* 의 lysine 생산 최적 pH가 중성~미알칼리성이라는 점 그리고 Alikhanyan 등<sup>(9)</sup>의 당밀을 기질로 사용하였을 때는 pH 5.0 이하에서는 적합치 않다는 보고와는 일치하는 바가 있다.

나) 온도

배양온도가 lysine 축적에 미치는 영향을 검토한 결과는 그림 2에서 보는 바와 같이 25~33°C에서는 균체의 생육은 별 차이가 없으나 lysine 의 생산은 30°C에서 가장 양호한 결과를 보였다. 33°C 이상에서는 균의 생육과 동시에 lysine 의 생산도 저하하였다.

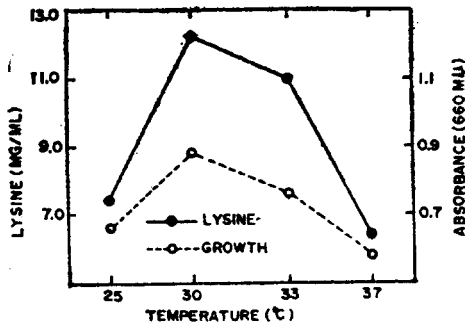


그림 2. Effect of temperature on lysine production

Medium: Urea 1.0%

All other legends are same as Fig. 1. A.

Cultivation: 86 hrs at 25~37°C.

다) 산소

통기조건 (산소의 공급량)이 lysine 생산에 미치는 영향을 검토하기 위해서 500 ml의 삼각플라스크에 배지액량을 그림 3 과 같이 변화시켜서 종균을 같은 농도가 되도록 접종하여 배양한 결과는 그림 3 에서 보는 바와 같이 20 ml/500 ml 플라스크에서 가장 양호한 결과를 보였다.

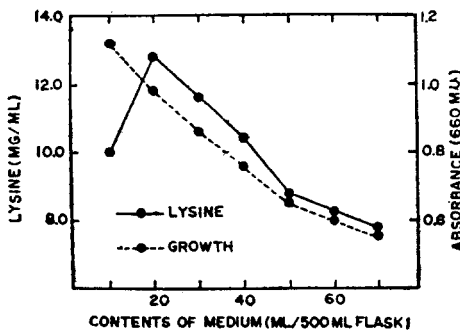


그림 3. Effect of aeration on lysine production

Medium: Same as Fig. 2.

Cultivation: 86 hrs at 30°C

Mindlin 과 Zaitzeva<sup>(9)</sup>는 *M. glutamicus*의 lysine 생산에서 산소의 공급량이 감소되면 lysine 생산은 억제되는 동시에 alanine, lactic acid가 축적된다고 보고한 바 있으며 Petrov 등<sup>(10)</sup>도 *Azotobacter* 속의 lysine 생산에서 100 ml 플라스크 대신 250 ml의 플라스크를 사용

함으로써 lysine 수율은 증가된다고 보고하였다. 본 실험에서 배지액량 10 ml/500 ml 일 때 균의 생육은 최대에 달하였으나 lysine의 생산이 감소된 원인에 대하여는 보다 정밀한 jar fermentor를 통해서 계속 검토함으로써 밝혀질 것이다.

라) 포도당 농도

Lysine 생산에 미치는 최적의 포도당 농도를 알기 위해서 표 5에서 보는 바와 같이 5~20%까지 변화시켜서 비교해 본 결과는 포도당 농도 7.5~12.5% 사이에서 양호하였다. 균의 생육은 15%까지는 증가하였으나 20%에서는 오히려 감소하였고 lysine의 생산도 감소하였다. 첨가한 포도당은 7.5%까지는 완전히 소비되었다.

Petrov<sup>(10)</sup> 등은 *Azotobacter* 속의 lysine 생산에서 포도당 농도를 낮추면 lysine 생산은 감소된다고 보고한 바 있다.

표 5. Effect of glucose concentration on lysine production

Glucose (%)	Growth	Final pH	Lysine (mg/ml)	Residual Glucose(%)
5.0	0.74	8.8	9.0	0
7.5	0.88	8.6	12.0	0
10.0	1.10	5.6	12.5	4.0
12.5	1.20	5.3	12.0	21.6
15.0	1.20	5.2	11.0	40.0
20.0	0.95	5.4	10.5	60.0

Medium and cultivation: Same as Fig. 2. except glucose.

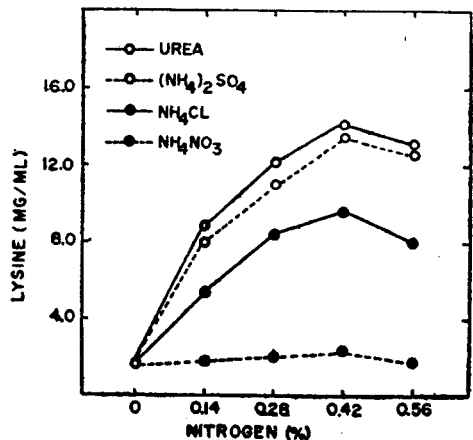


그림 4. Effect of nitrogen sources on lysine production

Medium: Same as Fig. 1. A and B plus 1.0% CaCO<sub>3</sub>  
Cultivation: 96 hrs at 30°C.

마) 질소원의 종류 및 농도

최적의 질소원을 선택하기 위해서 질소원으로 NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 및 urea 의 4 종류를 사용하였으며 그 첨가 농도는 그림 4 와 같다. Urea 이외의 질소원에 대하여는 CaCO<sub>3</sub>를 별도로 살균하여 1% 첨가하였다.

그림 4에서 보는 바와 같이 lysine 의 축적은 질소원 무두가 0.42%(N%)에서 최고에 달하였으며 그 중 urea 와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 양호한 결과를 보였다.

中山과 木下<sup>7)</sup>는 *Bacillus subtilis* 의 lysine 생산에서 urea 는 배양중 pH 를 중성 내지 미알카리성으로 유지하는데 효과적이라고 밝힌 바 있는데, 본 연구에서도 *Corynebacterium sp.* S-27-12 의 lysine 생산에서 같은 결과를 확인한 바 있다.<sup>(1)</sup>

바) 유기영양원의 종류 및 농도

최적의 유기영양원 및 농도를 알기 위해서 yeast extract, NZ-amine, vitamin free casein hydrolysate 및 corn steep liquor (CSL)를 표 6 과 같은 농도로 첨가하여 lysine 축적에 미치는 영향을 검토하였다.

표 6. Effect of organic nutrients on lysine production

Organic nutrients(%)	Growth	Final pH	Lysine (mg/ml)	
Yeast extract	0.4	0.58	5.6	6.3
	0.6	0.60	5.8	8.0
	0.8	0.62	5.4	8.1
	1.0	0.76	5.8	11.25
Vitamin free casein hydrolysate	0.4	0.58	5.4	7.6
	0.6	0.65	5.6	9.8
	0.8	0.72	8.6	10.4
NZ-amine	0.4	0.50	5.4	7.4
	0.6	0.80	5.4	12.6
	0.8	0.70	8.2	10.8
CSL	1.0	0.73	8.6	10.4
	1.2	0.50	5.4	5.2
	1.8	0.75	6.2	11.25
	2.4	0.88	5.4	10.8
	3.0	0.91	5.4	11.6

Basal medium: Glucose 8.0(%), Urea 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.001, Biotin 30(μg/D), Thiamine HCl 100(μg/D)

Cultivation: 86 hrs at 30°C.

표 6에서 보는 바와 같이 lysine 의 생산은 NZ-amine 0.6%의 첨가에서 가장 양호하였으며, yeast extract 는 1.0%, vitamin free casein hydrolysate 는 0.8%, CSL 는 1.8 이상에서 양호한 결과를 보였다.

木下等<sup>(11)</sup>은 *M. glutamicus* 의 homoserine 발효에서 biotin 급원으로 yeast extract 를, threonine 급원으로서 NZ-amine, peptone 및 casamino acid 등을 1% 내외로 첨가하는 것이 양호하였으나 이 때 부생 아미노산으로 lysine 이 생산되었음을 보고한 바 있다.

사) CSL 농도

유기영양원의 lysine 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 CSL 는 가장 저렴한 유기영양원으로 lysine 의 생산도 현저하였다. 따라서 CSL (전질소 1.4%)를 1.0~10.0%로 세분하여 첨가해 본 결과는 그림 5 와 같다. 균의 생육과 lysine 의 생산은 CSL 농도의 증가와 함께 증가하다가 CSL 4%의 첨가에서 최대에 달하였으며 이 농도 이상의 첨가에서는 서서히 감소하였다.

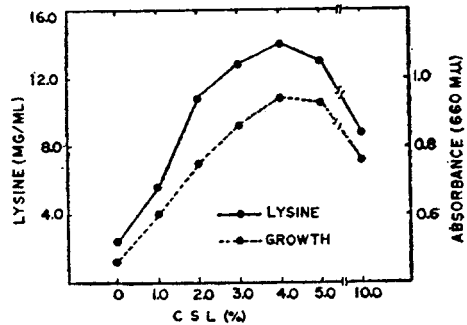


그림 5. Effect of CSL concentration on lysine production

Basal medium and cultivation: Same as Table 6.

Alikhanyan 등<sup>(8)</sup>은 아미노산 함량이 낮은 당밀을 탄소원으로 사용하였을 경우 CSL 의 농도를 높혀줄 필요가 있으며 sucrose 를 사용하였을 때는 8%까지 첨가함으로써 lysine 생산 수율은 증가된다고 보고하였다. 본 leucine 요구주가 leucine 이 다량 함유된 CSL 첨가시에 lysine 을 현저히 축적시키는 것은 흥미있는 일이며 CSL 중의 아미노산 패턴을 분석함으로써 다른 아미노산과의 관계에도 중요한 결과를 얻으리라 생각된다.

자) 아미노산

1) Leucine: 본 lysine 생산에 사용한 균주는 leucine 요구주로 기초배지에 유기영양원을 제외하고 leucine 만을 단독으로 첨가하여 균의 생육과 lysine 생산에 미치

는 영향을 검토하였다. 종균은 24 시간 배양하여 멸균 생리식염수로 2 회 세척한 후에 2%량으로 접종하였다.

그림 6에서 보는 바와 같이 lysine 의 생산은 leucine

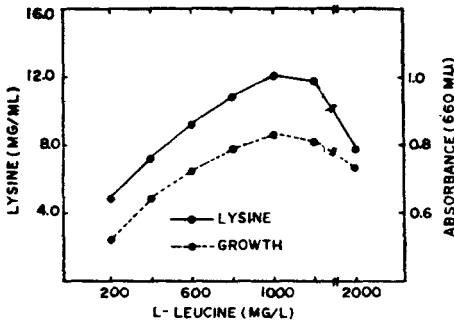


그림 6. Effect of L-leucine concentration on lysine production

Basal medium and cultivation: Same as Table 6.

농도가 증가함에 따라 점점 증가하여 1 mg/ml의 첨가 농도에서 최고에 달하였으며 그 이상의 농도에서는 서서히 감소되었다. 균의 생육도 1.2 mg/ml의 농도까지는 leucine의 첨가량에 비례해서 증가하다가 그 이상에서는 오히려 감소되었다.

2) 기타 아미노산: CSL의 첨가는 leucine 단독 첨가시보다 lysine 생산이 양호하였다. 따라서 leucine

표 7. Effect of amino acids on lysine production

Amino acids (mg/l)	Growth	Final pH	Lysine (mg/ml)	
None	0.85	5.4	9.8	
Glutamic acid	250	0.84	5.4	9.2
	500	0.86	5.4	9.7
Aspartic acid	250	0.84	5.4	10.1
	500	0.85	5.4	9.6
Isoleucine	250	0.88	5.4	10.8
	500	0.94	5.0	11.6
Valine	250	0.85	5.4	9.4
	500	0.86	5.4	9.6
Threonine	250	0.07	8.6	1.4
	500	0.07	8.6	1.4
Methionine	250	0.89	5.4	13.8
	500	0.83	5.0	12.4
Homoserine	250	0.92	5.0	9.5
	500	0.86	5.4	9.2

Basal medium and cultivation: Same as Table 6.

(1,000 mg/l)을 첨가한 배지를 기본배지로 하여 lysine 대사에 관여하리라고 추측되는 몇 가지 아미노산을 첨가하여 배양함으로써 lysine 생산에 미치는 영향을 검토하였다.

표 7에서 보는 바와 같이 isoleucine 이나 methionine 의 첨가에서는 lysine 의 생산이 다소 증가되었으나 threonine 의 첨가는 오히려 lysine 의 생산을 저해하였다. Homoserine, valine, glutamic acid 및 aspartic acid 는 별 영향을 미치지 않았다.

中山등<sup>(12)</sup>은 *M. glutamicus*의 lysine 발효에서 homoserine 요구주는 isoleucine에 대하여 상관성있는 요구를 한다고 보고한 바 있으며, 木下등<sup>(13)</sup>은 homoserine 생산에서 300 μg/ml의 methionine 첨가는 lysine 발효로 전환되었으며 이 때 homoserine 생산은 저해되었음을 보고하였다. 또 奈良등<sup>(14)</sup>은 homoserine 발효에서 isoleucine의 영향을 검토한 바 threonine을 100 μg/ml 농도로 첨가하고 isoleucine을 200 μg/ml 첨가하였을 때는 lysine 생산이 양호하였으나 isoleucine을 300 μg/ml 첨가하거나 threonine 200 μg/ml와 isoleucine 200 μg/ml을 첨가하면 lysine과 homoserine이 동량, 그리고 threonine 200 μg/ml와 isoleucine 300 μg/ml의 첨가는 homoserine의 생산이 양호하였음을 보고하였다. Mindlin과 Zaitseva<sup>(15)</sup>는 threonine 3 mg/ml의 첨가는 lysine 생산을 1/10로 감소시켰으며 threonine 저농도 첨가(0.5 mg/ml)에서 isoleucine은 생육을 촉진시키지만 threonine 최적량(1 mg/ml)이면 isoleucine의 첨가는 효과가 없고 lysine 생산도 억제되었음을 보고하였으며 Daoust와 Staudt<sup>(16)</sup>는 threonine이 어느 농도까지든 농도에 비례해서 lysine 생산을 억제하지만 methionine은 고농도 첨가에서 lysine 생산을 억제한다고 보고하였다.

본 균주가 lysine 발효에서 isoleucine 이나 methionine 첨가시에 그 생산이 촉진되고 threonine 첨가시에 억제되는 현상은 위와 같은 보고와는 일치하는 바 있으며, 앞으로 보다 다양한 양의 첨가 실험에서 그 최적농도가 밝혀질 것이다.

자) Biotin 및 thiamine-HCl

본 번이주의 균주는 biotin과 thiamine-HCl을 요구하기 때문에 이들의 첨가 농도를 변화시켜서 lysine 생산에 미치는 영향을 검토하여 본 결과는 표 8에서 보는 바와 같이 thiamine-HCl을 제외하고 biotin만 첨가하였을 때는 biotin의 양은 5 μg/l 이상에서는 농도에 관계없이 lysine 생산이 거의 일정하였으나 thiamine-HCl은 100 μg/l 이상 첨가함으로써 lysine 생산은 양호한 결과를 보였다. 그러나 thiamine-HCl을 100 μg/l 이상 첨가하여도 biotin을 첨가하지 않으면 lysine의 생

산은 현저히 감소되었다. 따라서 본 균의 lysine 발효에서 biotin은 균의 생육이나 lysine 생산에 필수적인 것이지만 thiamine-HCl은 lysine 생산보다는 균의 생육과 더 관계가 있는 것이 아닌가 생각된다.

증가와 함께 lysine 생산은 증가하여 0.04% 첨가에서 가장 좋은 결과를 보였고 0.05% 이상 첨가에서는 오히려 서서히 감소되었다.

그림 8. Effect of biotin and thiamine-HCl on lysine production

Biotin (μg/l)	Thiamine-HCl (μg/l)	Growth	Final pH	Lysine (mg/ml)
0	0	0.46	5.4	0.8
5	0	0.60	5.4	8.4
10	0	0.63	5.4	8.4
30	0	0.68	5.4	7.8
50	0	0.67	5.4	7.3
100	0	0.63	5.4	7.6
300	0	0.62	5.4	9.0
0	100	0.51	5.4	2.4
5	100	0.78	5.4	7.8
10	100	0.78	5.4	9.8
30	100	0.84	5.4	10.2
50	100	0.84	5.4	10.0
100	100	0.85	5.2	10.2
300	100	0.85	5.2	10.3
0	200	0.52	5.4	2.6
5	200	0.94	5.2	10.0
10	200	0.94	5.2	10.6
30	200	0.94	5.2	10.8
50	200	0.94	5.2	10.3
100	200	0.90	5.4	10.4
300	200	1.00	5.0	10.6

Basal medium: Glucose 10.0(%), Urea 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, vitamin free casein hydrolysate 0.4. Yeast extract 0.1(%)

Cultivation: 86hrs at 30°C

Areshkina<sup>(14)</sup> 등은 lysine 발효에서 biotin이 alanine, glutamic acid 및 lactic acid의 생산을 억제하고 aspartic acid 생산을 촉진한다고 하였으며 Kutseva와 Klyueva<sup>(15)</sup> 는 biotin과 methionine의 60% 이상은 CSL에서 온다고 보고한 것은 본 균이 CSL 첨가시에 lysine 생산이 양호한 것과 일치되는 점이 있다.

차) 마그네슘 및 기타 금속이온

Mg<sup>2+</sup> 이온을 그림 7 과 같은 농도로 첨가하여 lysine 생산에 미치는 영향을 검토한 바, 그림 7에서 보는 바와 같이 Mg<sup>2+</sup> 이온을 첨가하지 않은 대조구에서는 lysine 생산은 지극히 불량하였으나 Mg<sup>2+</sup> 이온 농도의

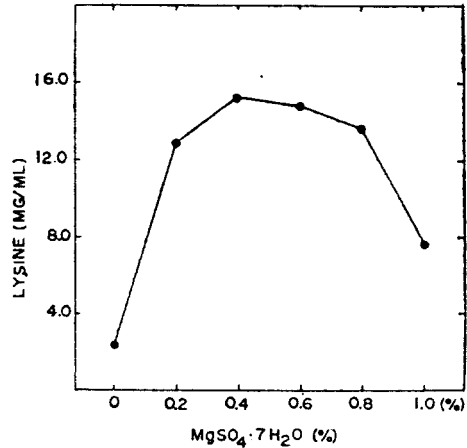


그림 7. Effect of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O concentration on lysine production

Basal medium: Glucose 10.0(%), Urea 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, Yeast extract 0.1, Vitamin free casein hydrolysate 0.6(%)  
Biotin 30(μg/l), Thiamine-HCl 200 (μg/l)

Cultivation: 96 hrs at 30°C

Mg<sup>2+</sup> 이온 이외의 금속이온을 단독 또는 복합으로 첨가하여 lysine 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 표 9에서 보는 바와 같이 Cu<sup>2+</sup> 이온과 Mo<sup>2+</sup> 이온을 제외하고는 모두 대조구보다 양호하였으며 특히 Fe<sup>2+</sup> 이온과 Zn<sup>2+</sup> 이온의 복합첨가에서는 lysine 생산은 현저하였다.

木下 등<sup>(11)</sup> 은 homoserine 발효에서 Mg<sup>2+</sup> 이온의 첨가는 필수적이며 Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup> 이온을 단독으로 첨가하면 homoserine이나 lysine 생산에 거의 영향을 미치지 않으나 2개 내지 전부를 복합 첨가하면 homoserine의 생산은 저해되고 lysine의 생산은 그 정도의 저해는 일어나지 않는다고 보고한 바 있다.

카) 항생물질

항생물질의 첨가가 lysine 축적에 미치는 영향을 검토하기 위해서 표 10과 같은 농도로 첨가시간을 달리하여 비교해 본 결과 penicillin 40 U/ml을 24~40시간 배양후에 첨가하였을 때 lysine의 생산은 최고에 달하였으며, 이 때 lysine의 생산은 대조구보다 40.3% 증가되었다. 重藤<sup>(16)</sup> 은 *M. glutamiscus*의 변이주에 의한 lysine 생산에서 2,000 l 발효조를 사용하여 발효도중



9. Effect of metal ions on lysine production

Metal ions	(mg/l)	Growth	Final pH	Lysine (mg/ml)
None		0.70	5.2	8.2
Fe <sup>++</sup> (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	10	0.78	5.4	13.2
Fe <sup>++</sup> (FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	10	0.73	7.0	13.3
Fe <sup>+++</sup> [Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·XH <sub>2</sub> O]	10	0.75	8.4	15.0
Mn <sup>++</sup> (MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	10	0.80	6.0	12.0
Mn <sup>++</sup> (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	10	0.71	8.0	16.8
Zn <sup>++</sup> (ZnCl <sub>2</sub> )	10	0.83	6.0	13.4
Cu <sup>++</sup> (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	10	0.75	8.6	7.2
Mo <sup>6+</sup> [(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O]	10	0.79	5.4	8.6
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O + MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	0.76	8.0	12.8
Fe <sup>++</sup> + Mn <sup>++</sup> + ZnCl <sub>2</sub>	10	0.74	8.4	13.8
Fe <sup>++</sup> + Mn <sup>++</sup> + CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10	0.90	7.6	8.6
Fe <sup>++</sup> + Mn <sup>++</sup> + Mo <sup>6+</sup>	10	0.75	6.2	9.0
Fe <sup>++</sup> + Zn <sup>++</sup>	10	0.75	6.8	18.6
Mn <sup>++</sup> + Zn <sup>++</sup>	10	0.73	6.2	13.4
All metal ions	10	0.79	5.4	9.0
All metal ions	5	0.75	8.2	11.2

Basal medium: Glucose 10.0(%), Urea 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03, Yeast ext 0.1, NZ-amine 0.6, Biotin 30(μg/l), Thiamine-HCl 200(μg/l)  
Cultivation: 96 hrs at 30°C

10. Effect of antibiotics on lysine production

Antibiotics	Addition time(hrs)	Growth	Final pH	Lysine (mg/ml)	
None		0.92	5.0	11.4	
Penicillin (U/ml)	40	15	0.54	6.0	12.0
	24	0.96	5.0	16.0	
	40	0.72	5.8	16.0	
100	15	0.68	5.0	11.6	
	24	0.90	4.8	13.0	
	40	0.82	6.2	15.0	
Erythromycin (μg/ml)	5	15	0.70	5.2	10.2
	24	0.76	5.2	11.5	
	40	0.88	6.0	13.6	
20	15	0.62	5.2	10.5	
	24	0.82	6.0	14.2	
	40	0.80	6.0	12.4	
50	15	0.62	5.0	10.5	
	24	0.83	5.2	13.8	
	40	0.83	6.0	11.8	

Medium: Glucose 10.0(%), Urea 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, Yeast extract 0.1, NZ-amine 0.6(%), Biotin 30(μg/l), Thiamine-HCl 200(μg/l)  
Cultivation: 96 hrs at 30°C

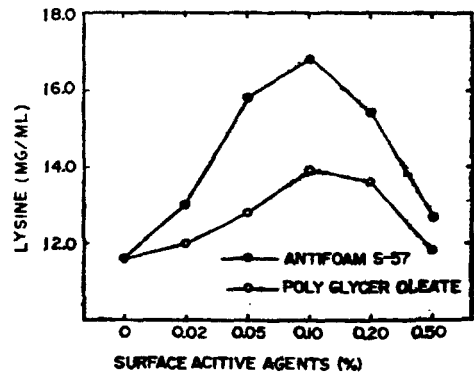
배양액중에 발생하는 복귀변이주의 증식을 특이적으로 억제하는 Oleandomycin 1.3 μg/ml을 배양 18, 39 및 62 시간후에 경시적으로 첨가함으로써 lysine 생산을 41.2 % 증수한 바 있다. 항생물질을 첨가함으로써 lysine 이외의 다른 아미노산으로의 발효전환 현상은 볼 수 없었으며, 배양초기에 첨가하는 것은 오히려 lysine의 생산을 저해하였다.

타) 계면활성제

본 균주는 배양중 발포가 심하기 때문에 계면활성제가 lysine 생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 그림 8에서 보는 바와 같이 antifoam S-57 및 polyglyceroleate가 다 0.1%의 첨가에서 가장 양호한 결과를 보였으며 antifoam S-57은 소포제로서도 soy bean oil보다 유효하였다.

파) 발효경과

Urea를 질소원으로하여 플라스크 배양(80 ml 배양액 / 1 플라스크)을 통한 lysine 발효의 한 예는 그림 9와 같다.



8. Effect of surface active agents on lysine production

Medium and cultivation: Same as Table 10.

요 약

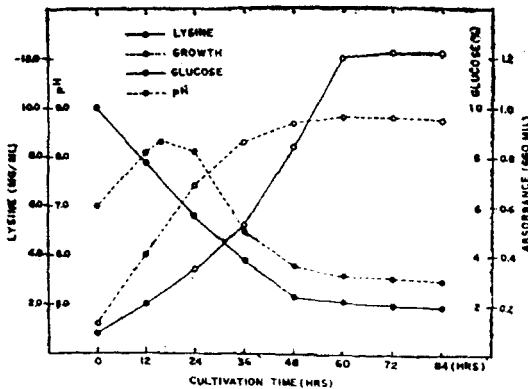


그림 9. Time course of lysine fermentation in *Brev. flavum* U46-N59

Medium: Glucose; 10.0, Urea; 1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.05,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.001,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0.001, Yeast extract; 0.1, Vitamin free casein hydrolysate; 0.5(%), Biotin; 30 $\mu\text{g/l}$ , Thiamine-HCl; 100  $\mu\text{g/l}$ .

Cultivation; 30°C, 180 strokes/min., 80 ml/1 l flask

그림 10에서 보는 바와 같이 균의 생육은 배양 48 시간만에 최고에 달하였으며 pH는 균의 생육과 동시에 알칼리성으로 변하여 발효 15 시간 후에는 pH 8.6으로 되었다가 그 이후에는 점점 떨어져서 배양 36 시간 후에는 6.5로 되고 최종 84 시간 후에는 5.0으로 되었다. 포도당은 배양 48 시간만에 80%가 소비되었으며 그 이후에는 서서히 소비되어 84 시간 후에는 90%가 소비되었다. Lysine의 생산은 발효경과와 동시에 36 시간까지는 서서히 증가하다가 36 시간부터 60 시간 사이에 급증하여 최종 84 시간 후에는 12 mg/ml에 도달하였다.

하) 최적조건하에서의 lysine 생산

이상에서 몇가지 배양조건을 검토한 결과를 종합하여 포도당 100, urea 10, CSL 40,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4, antifoam S-57 1g;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{X} \cdot \text{H}_2\text{O}$  10,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10 mg; biotin 30, thiamine-HCl 100  $\mu\text{g}$ ; 증류수 1 l로 된 pH 7.5의 합성배지에 *Brev. flavum* U46-N59를 28°C에서 4일간 진탕배양 (20 ml 배양액/500 ml 플라스크, 180 회 왕복진탕/분) 하여 최대 21.6 mg/ml의 lysine을 생산하였다. Penicillin은 40 U/ml의 농도가 되도록 배양 36 시간 후에 첨가하였다.

전보에서 분리 확보한 lysine 생산균주 *Corynebacterium* sp. S-27-12와 *Brevibacterium flavum* ATCC 15168 및 *Micrococcus glutamicus* ATCC 13032를 친주로 하여 자외선,  $\text{Co}^{60}$  및 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine를 처리, 90여주의 영양요구성 변이주를 분리하고 이들의 lysine 생산능을 비교하여 lysine 생산이 8 mg/ml 이상인 균주 6주를 선정하였다. 이들 중 leucine 요구주 *Brev. flavum* U46-N59의 lysine 축적조건을 검토한 결과를 종합하여 포도당 100, urea, 10, CSL 40,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4, antifoam S-57 1g;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{X} \cdot \text{H}_2\text{O}$  10,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10 mg; biotin 30, thiamine-HCl 100  $\mu\text{g}$ ; 증류수 1 l로 된 pH 7.5의 합성배지에 *Brev. flavum* U46-N59를 28°C에서 4일간 플라스크(20 ml/500 ml)에 진탕배양하였을때 (180진탕/분) 최대 21.6 mg/ml의 lysine을 생산하였다. Penicillin은 40 U/ml의 농도가 되도록 배양 36 시간 후에 첨가하였다.

참 고 문 헌

- 1) 민태익, 권태완: 한국식품과학회지, 3, 68 (1971).
- 2) Pontecorvo, G.: *J. Gen. Microbiol.*, 3, 122 (1948).
- 3) 東京大學農學部農藝化學教室編, 實驗農藝化學(下卷), 朝倉書店, 東京, 414 (1960).
- 4) Difco manual: *Difco Laboratories*, 9th edition, 235 (1969).
- 5) Erickson, L. E. and Kurz: *W.G. Biotech. Bioeng.* 4, 23 (1962)
- 6) Aida, T., Uemura, T. and Nakajima, N.: *Tohoku J. Agr. Research*, 11, 377 (1960)
- 7) 中山清, 木下祝郎: 日本農藝化學會誌, 35, 119 (1960).
- 8) Alikhanyan, S. I., Zaitseva, Z. M., Arakelova, V. A. and Mindlin, S. Z.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 2, 655 (1966) [*Chem. Abst.* 66, 847032 (1967)].
- 9) Mindlin, S. Z. and Zaitseva, Z. M.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 2, 168 (1966).
- 10) Petrov, D. F., Orobinskii, I. I., Shilova, M. A., Grableva, T. I. Tarakanova E. G. and Zakirova, T. F.: *Seleksiya Mikrobov, Akad. Nauk. SSSR Sibirsk. Otd., Lab. Tsitol Rast. i Apomiksisa Biol. Inst.* 128-35 (1965). [*Chem. Abst.* 64, 14920e (1966)].
- 11) 木下祝郎, 飯島廣年, 奈良高, 藤田忠三: *Amino acids*, 2, 125 (1960).

- 12) 中山清, 北田ゴ平, 木下祝郎: *Amino acids*, 2, 105 (1960).  
Liepins G.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 1, 396 (1965) [Chem. Abst. 64, 1315f (1966)].
- 13) Daoust, D. R. and Stodt, T. H.: *Develop. Ind. Microbiol.*, 7, 22 (1966).  
15) Kutseva, L. S. and Klyueva, N. M.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 2, 729 (1966). [Chem. Abst., 66, 73486k (1967)].
- 14) Areshkina, L. Y., Beker, M. E., Bukin, V. N., Karklins, R., Klyueva, N. M., Kutseva, L. S. and  
16) 重藤稔: 日本特許出願公告, 昭38-26943 (1963).